

**Erhebungen über den Hemmstoffgehalt von
Rohmilchproben im Molkereieinzugsgebiet
eines Landkreises in Nordrhein-Westfalen**

Jürgen Flaßhoff

1974

Aus dem Bereich Hygiene und Technologie der Lebensmittel
tierischen Ursprungs der Universität München
- Tierärztliche Fakultät -

Vorstände: Prof.Dr.Dr.h.c. L. Kotter und Prof.Dr. G. Terplan

Erhebungen über den Hemmstoffgehalt von
Rohmilchproben im Molkereieinzugsgebiet
eines Landkreises in Nordrhein-Westfalen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Jürgen Flaßhoff
aus Dinslaken

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan : Prof.Dr. E. Dahme

Referent : Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent : Prof. Dr. H. Kräußlich

Tag der Promotion : 22.2. 1974



INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	Einleitung	3
2.	Schrifttum	4
2.1.	Vorkommen von Antibiotika in Rohmilch . . .	4
2.2.	Nachweis hemmstoffhaltiger Milch unter Verwendung von <i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> als Testkeim	9
2.2.1.	Agardiffusionstest (Blättchentest, Lochtest)	10
2.2.2.	Brillantschwarz-Reduktionstest	17
2.3.	Einfluß der Erhitzung auf die Stabilität von Antibiotika	21
2.4.	Unspezifische Hemmstoffe in der Milch . . .	29
3.	Eigene Untersuchungen	32
3.1.	Material	32
3.2.	Methodik	36
3.2.1.	Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) . . .	37
3.2.2.	Agardiffusionstest mit Plate Count Agar (PC) als Nährmedium	38
3.2.3.	Agardiffusionstest mit Diagnostic Sensitivity Test Agar (DST) als Nähr- medium	40
3.3.	Befragung der Milchlieferanten	41
3.4.	Ergebnisse	42

3.4.1.	Häufigkeit hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilchproben in fünf Molkereien des Kreises Tecklenburg	42
3.4.2.	Einfluß einer Erhitzung der hemmstoffpositiven Rohmilchproben auf ihren Gehalt an nachweisbaren Rückständen	46
3.4.3.	Einfluß des Zusatzes von Penicillinase zu hemmstoffpositiven Rohmilchproben auf ihren Gehalt an nachweisbaren Rückständen .	50
3.4.4.	Einfluß der Probenherkunft (Molkereieinzugsbereich) auf den Anteil hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilch	52
3.4.5.	Auskünfte der Milchlieferanten	59
4.	Besprechung der Ergebnisse und Diskussion	60
5.	Zusammenfassung	75
6.	Summary	77
7.	Literaturverzeichnis	79

1. EINLEITUNG

Seit der Einführung von Antibiotika zur Behandlung von Infektionskrankheiten - insbesondere von Mastitiden - und der daraus resultierenden Ausscheidung von Rückständen mit der Milch sowie der gehäuften Anwendung von Reinigungs- und Desinfektionsmitteln in der Milchwirtschaft haben sich neue Probleme für Milchhygiene und Milchwirtschaft ergeben. Prinzipiell sind dabei zunächst die gesundheitlichen Bedenken hinsichtlich einer Aufnahme antibiotikahaltiger Milch durch den Verbraucher zu berücksichtigen, wobei allergische Reaktionen im Vordergrund stehen und Warnungen bezüglich einer Resistenzübertragung an pathogene Mikroorganismen sich mehren. In der Verarbeitung führt antibiotikahaltige Milch zu Fehlproduktionen und so zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, in einem Landkreis Nordrhein-Westfalens Erhebungen über die Häufigkeit, mit der hemmstoffhaltige Milch zur Ablieferung an Molkereien gelangt, vorzunehmen. Durch Befragung der Lieferanten hemmstoffhaltiger Milch sollten dann Gründe für Erzeugung und Ablieferung der betreffenden Milch ermittelt werden. Im Rahmen der Untersuchungen sollten auch Brillantschwarz-Reduktionstest und Agardiffusionstest mit Plate Count Agar bzw. Diagnostic Sensitivity Test Agar jeweils mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* als Testkeim auf ihre Eignung zum Nachweis von Hemmstoffen geprüft werden.

2. SCHRIFTTUM

2.1. V o r k o m m e n v o n A n t i b i o t i k a i n R o h m i l c h

Das Vorkommen von Antibiotikarückständen in Milch ist - wie vorher erwähnt - sowohl im Hinblick auf eine mögliche Gefährdung der menschlichen Gesundheit als auch bezüglich eventuell auftretender wirtschaftlicher Schäden bei der Herstellung fermentierter Milcherzeugnisse von Interesse, abgesehen davon, daß das Inverkehrbringen arzneimittelhaltiger Milch gemäß § 3 Nr. 1 g der 1. AVO zum Milchgesetz verboten ist. Im Laufe der Zeit sind daher diesbezüglich zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden. Die der Arbeit von MATTHEIS (1971) entnommene und z.T. ergänzte Tabelle gibt einen Überblick über in Deutschland ab 1961 veröffentlichte Untersuchungen zum Vorkommen von Antibiotikarückständen in Rohmilch.

Übersicht 1: Häufigkeit hemmstoffhaltiger Rohmilchproben

Autoren	Untersuchungs- zeitraum	Verfahren	Proben- anzahl	Anteil pos. Proben (%)
MOCKLER (1961)	Jan.-Dez. 59	TTC-Test	317 *)	1,3
FRANK (1962)	Juli 61 - Juni 62	Jogh.-Test	5727	2,93
FRANK (1962)	Juli 61 - Juni 62	Jogh.-Test	60	3,5
FRANK (1964)	-	Jogh.-Test	-	bis 2
RACKOW und WELZ (1962)	Jan. 61 - April 62	Jogh.-Test	593 *)	2,2

RACKOW und WELZ (1964)	Mai 62 - Dez. 63	Jogh.-Test	605 *)	2,5
OBIGER (1963)	Juli/Aug. 62	Agarlochtest mit Sc.therm.	1350	3,19
BECK (1964)	-	Jogh.-Test	7820	3,6
BECK (1964)	-	Jogh.-Test	1222 *)	15,3
MIETH und WILKE (1965)	-	-	-	0,5
KRAACK und TOLLE (1967)	-	Jogh.-Test	500	0,6
KRAACK und TOLLE (1967)	-	BRT	500	1,6
TOLLE et al. (1968)	Juni/Sept. 1967	BRT	6027	2,2
TOLLE et al. (1968)	Febr./März 1968	BRT	4772	3,6
KRAACK und TOLLE (1969)	-	BRT	19274	2,4
LIMMER (1969)	-	Jogh.-Test	-	ca. 2
MÜLLER (1969)	-	BRT	ca. 1500	8

Zeichenerklärung:

Jogh.-Test = Joghurt-Test; BRT = Brillantschwarz-
Reduktionstest; Agardiff.-Test = Agardiffusionstest
mit *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*;
*) = Vorzugsmilchproben; - = keine oder ungenaue
Angaben.

Autoren	Untersuchungs- zeitraum	Verfahren	Proben- anzahl	Anteil pos. Proben (%)
BRUNN (1971)	-	Jogh.-Test	1000	0,7
		BRT	1000	1,0
		Agardiff.Test	1000	0,3
MATTHEIS (1971)	Mai/Dez. 1970	Agardiff.Test	5100	1,1
	April/Juli 1971	BRT	3150	1,3
NEUMANN et al (1971)	September 1968/ Juli 1971	BRT	479630	0,52
LUPKE (1972)	September 1968/ April 1972	BRT	672313	0,57
NEUMANN (1972)	September 1968/ September 1972	BRT	808657	0,52
HENTSCHKE (1972)	-	Agardiff.Test	4048	0,9
KLEIN (1972)	Frühjahr 1971	BRT	ca. 12000	0,9
LIMMER und WÖBBECKE (1972)	-	Jogh.-Test	4223	0,9
SCHRAUDY und RAUSCHER (1972)	-	BRT	29296	0,44
			6058	0,13
TOLLE (1973)	-	BRT	17006	2,68

Nach TOLLE et al. (1968) waren bei 131 von 172 hemmstoffhaltigen Proben die Rückstände durch Penicillinase inaktivierbar. KRAACK und TOLLE (1969) fanden unter 202 hemmstoffpositiven Proben 130 (64,3 %), die nachweisbar Penicillin enthielten. Die Autoren vermuten, daß der tatsächliche Anteil jedoch noch höher lag, da das Penicillin in Kombinationspräparaten mit anderen Antibiotika wie Tetracyclin, Streptomycin und Chloramphenicol oder auch Sulfonamiden mit Penicillinase nicht selektiv nachgewiesen wurde.

BRUNN (1971) führte bei 1000 Bestandsmilchproben den allgemeinen Hemmstofftest vergleichend im Joghurt-Test, im Agardiffusionstest mit Zusatz von Brillantschwarz bzw. in Form des BRT durch und kam zu folgenden Ergebnissen: Im Joghurt-Test waren 7 Proben (0,7 %), im Agardiffusionstest 3 Proben (0,3 %) und im BRT-Test 10 Proben (1,0 %) positiv.

MATTHEIS (1971) untersuchte von Anfang Mai bis Ende Dezember 1970 5100 Sammelmilchproben im Molkereieinzugsgebiet Wilhelmshaven. Die Durchführung des Hemmstofftestes erfolgte mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* (C 953) als Testkeim nach dem von GALESLOOT und HASSING (1962) erstmals beschriebenen Verfahren in Anlehnung an die von TERPLAN und ZAADHOF (1969) modifizierte Methodik. Dabei wurden insgesamt 55 Proben (1,1 %) als positiv ermittelt. Anfang Mai wurde der höchste Anteil an positiven Proben (2,7 %) festgestellt, der niedrigste von Mitte Juni bis Anfang Juli (bis 0,3 %). Alle Proben enthielten durch Zusatz von Penicillinase vollständig oder teilweise inaktivierbare Rückstände. Von 3150 Bestandsmilchproben des gleichen Einzugsbereiches, die im darauffolgenden Jahr in der Zeit von Anfang April bis Mitte Juli geprüft wurden, waren 41 (1,3 %) hemmstoffhaltig.

NEUMANN et al. (1971) wiesen bei der Anlieferungskontrolle in Schleswig-Holstein von Anfang September 1968 bis Ende Juni 1971 in 2518 von 479 630 Proben (0,52 %) Hemmstoffe mit dem BRT nach; 2017 Proben davon enthielten Penicillin. Ende September 1972 betrug die Anzahl der untersuchten Proben 808 657; davon waren 4193 (0,52 %) hemmstoffhaltig (NEUMANN, 1972). 3336 (79,6 %) der hemmstoffpositiven Proben waren Penicillin-positiv. LUPKE (1972) gab zuvor an, daß bis Ende April 1972 3855 (0,57 %) Proben positiv reagierten und 3147 (81,6 %) davon Penicillin enthielten.

HENTSCHKE (1972) berichtete, daß von 4048 in Berlin mit dem konventionellen Agardiffusionstest geprüften Einzelmilchproben 0,7 % Penicillin enthielten und weitere 0,2 % andere das Bakterienwachstum hemmende Substanzen.

KLEIN (1972) wies in Rheinland-Pfalz mit dem BRT im Frühjahr 1971 in 0,9 % von fast 12 000 Ab-Hof-Milchproben aus dem Einzugsgebiet von 5 Molkereien Hemmstoffe nach. LIMMER und WÜBBECKE (1972) untersuchten 4223 Anlieferungsmilchproben mit dem Säuerungstest. 182 Proben zeigten eine Verzögerung der Milchgerinnung, bei 37 (0,9 %) war die Milch nach mehreren Stunden nicht dickgelegt und nicht entfärbt. Bei diesen 37 Proben wurde auf das Vorhandensein von Hemmstoffen geschlossen.

SCHRAUDY und RAUSCHER (1972) fanden in 130 von 29 296 Rohmilchproben aus der Anlieferung im Einzugsgebiet der Bayerischen Landesanstalt für Tierseuchenbekämpfung Oberschleißheim Hemmstoffe. 126 der hemmstoffhaltigen Proben enthielten Penicillin (97 %), das entspricht 0,43 % der untersuchten Rohmilchproben. Anlieferungsmilch für die Markenmilcherzeugung enthielt in 0,47 % der Proben Penicillin. Von 6058 Vorzugsmilchproben waren 0,13 % antibiotikahaltig. Bei 11 146 Rohmilchplanproben aus drei Regierungsbezirken Südbayerns war zeitlich eine

deutliche Zunahme penicillinhaltiger Proben festzustellen. Betrug deren Anteil z.B. 1969 noch 0,26 % und 1970 0,27 %, so stieg er 1971 um rund ein Drittel auf 0,40 % an.

TOLLE (1973) erwähnte, daß im Durchschnitt in 2,68 % der Anlieferungsmilchen aus 12 Molkereieinzugsgebieten Antibiotika festgestellt wurden. Dabei schwankte der Anteil der hemmstoffpositiven Proben in den einzelnen Gebieten von 0,1 % - 7,5 %. Zwischen 23,5 % und 72 % der positiven Proben enthielten Penicillin.

2.2. Nachweis hemmstoffhaltiger Milch unter Verwendung von *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* als Testkeim

Unter dem Begriff Hemmstoffe werden Substanzen zusammengefaßt, die mikrobiologische Wachstumsvorgänge zu hemmen vermögen. Hemmstoffe können nach SEELE (1973) sein: Der Kuh applizierte Chemotherapeutika - insbesondere die zur Mastitisbekämpfung verwendeten Antibiotika und Sulfonamide -, Reinigungs- und Desinfektionsmittel, futterpflanzenbedingte Milchinhaltsstoffe, rohmilcheigene Substanzen, (z.B. Lactenine) Mastitismilch, Milchinhaltsstoffe nach MKS-Schutzimpfung, Pflanzenschutzmittel, Leberegelbekämpfungsmittel, vielleicht auch Unkrautbekämpfungsmittel sowie Immisionsrückstände auf Futterpflanzen (z.B. Schwermetalle).

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch werden chemisch-physikalische und mikrobiologische Methoden verwendet. Daneben gibt es Nachweise, die auf Anfärbung der Antibiotika-Mastitispräparate beruhen (Literatur bei TERPLAN

und ZAADHOF, 1967). Die chemisch-physikalischen Methoden arbeiten zwar sehr exakt, sind aber generell zu kosten- und zeitaufwendig und verlangen Speziallabors sowie eine lange methodische Einarbeitung. Diese Methoden bieten sich daher für Routineuntersuchungen bis heute noch nicht an. In der Praxis werden hauptsächlich mikrobiologische Nachweisverfahren angewendet. Sie beruhen auf der besonderen Empfindlichkeit einiger Test-Mikroorganismen, wie *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, gegenüber Hemmstoffen sowie meist auch einer relativ hohen Unempfindlichkeit gegenüber störenden Substanzen. In dieser Arbeit soll jedoch nur auf *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* näher eingegangen werden. Auf die verschiedenen Faktoren, die Einfluß auf die Ergebnisse nehmen können, ist im deutschen Schrifttum unter anderem von KLEIN (1957), OBERZILL (1967) sowie PICHNARCIK, WENZEL und GISSKE (1969) umfassend hingewiesen worden.

2.2.1. Agar-Diffusionstest (Blättchentest, Lochtest)

GALESLOOT und LABOTS (1959) isolierten bei der Untersuchung von Milch auf thermophile Sporenbildner auch einen Stamm, den sie als *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 bezeichneten. Dieser Keim hat folgende Eigenschaften: Er wächst nicht mehr bei 37° C, ist unbeweglich, reduziert Nitrat nicht, bildet kein Acetyl-methylcarbinol, hydrolysiert Casein nicht, baut Glukose, Laktose und Saccharose sowie Stärke ab und wird durch Glukose nicht im Wachstum gehemmt. SEELEMANN und OBIGER (1963) kamen bei der Prüfung der biochemischen Eigenschaften außerdem zu dem Ergebnis, daß auch Raffinose, Trehalose, Inulin, Glyzerin, Sorbit und Mannit gespalten werden, eine Kochsalzresistenz jedoch nicht besteht.

Diesen Stamm benutzten GALESLOOT und HASSING (1962) zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch im Agardiffusionstest (Filterpapierscheibchen von Schleicher und Schüll). Dabei erwies sich der Keim als sensitiver gegenüber Penicillin (0,0025 IE/ml Milch) als der von IGARASHI et al. (1961) verwendete Testkeim *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7954 (0,005 IE Penicillin/ml) und weniger anspruchsvoll hinsichtlich seiner Anzüchtung (keine Belüftung erforderlich). Außerdem wurde aufgrund von Vergleichsuntersuchungen an über 500 Rohmilchproben, bei denen eine Hemmung durch originäre Hemmstoffe nicht auftrat, vorgeschlagen, auf eine Erhitzung der Milchproben vor dem Ansatz zu verzichten und eine solche nur - wenn gewünscht - bei einer eventuellen Bestätigungsuntersuchung vorzunehmen. Untersuchungen zeigten auch, daß 10 Einheiten Nisin/ml keine Hemmung bewirkten, so daß die Anwesenheit Nisin-bildender Streptokokken in der Milch nicht stört. Allerdings setzt das von GALESLOOT und HASSING beschriebene Verfahren eine längere Bebrütungszeit (2 1/2 Stunden bei 55° C) voraus als jenes mit *B. stearothermophilus* ATCC 7954 (1 1/4 Std).

JACOBS (1963) sowie SEELEMAN und OBIGER (1963) bestätigten die Penicillinempfindlichkeit von *B. calidolactis* durch Vergleichsuntersuchungen mit Joghurtkulturen. Die letztgenannten Autoren fanden, daß Milch mit 0,002 IE Penicillin/ml im Blättchentest noch Hemmhöfe von 18-20 mm Weite ausbildeten (bei Filterpapierblättchen mit 12 mm Durchmesser).

CRAWFORD und GALLOWAY (1964) modifizierten die Methode von GALESLOOT und HASSING teilweise, indem sie den pH-Wert des Nährbodens von 7,0 auf 8,0 erhöhten, kleinere Papierscheibchen (Whatman-Papier) verwendeten und eine Kontrollprobe mit 0,02 IE Penicillin/ml Milch ansetzten. Proben, die positive Resultate erbrachten, wurden am gleichen Tag, spätestens jedoch nach 36 Stunden, im

doppelten Ansatz nochmals geprüft, nachdem sie zuvor in kochendem Wasser auf 95° C erhitzt worden waren. Proben, die auch jetzt Hemmhöfe mindestens der gleichen Größe wie die Kontrollprobe aufwiesen, wurden beanstandet, da sie damit nicht den Anforderungen des Schottischen Milk Marketing Board entsprachen. NICKELS (1967) beschrieb in Schweden ebenfalls ein auf Anwendung von *B. calidolactis* beruhendes Verfahren, mit dem nach 1 1/2 bis 2 Stunden Bebrütung Mengen ab 0,005 IE Penicillin/ml nachweisbar waren. Zur Bestätigung, daß die Hemmzonen nicht durch originäre Hemmstoffe bedingt sind, wird von ihm eine Bestätigungsuntersuchung nach vorheriger 10minütiger Erhitzung in kochendem Wasser empfohlen.

Aufgrund der von verschiedenen Seiten bestätigten hohen Penicillinempfindlichkeit des *B. calidolactis* wurde vom Internationalen Milchwirtschaftsverband beschlossen, das von GALESLOOT und HASSING entwickelte Verfahren vergleichsweise mit anderen üblicherweise zur Anwendung kommenden Verfahren auf Empfindlichkeit, Zuverlässigkeit, Spezifität, Durchführbarkeit, Schnelligkeit und Kosten zu testen (IMV, 1967). Auf der 53. Jahresversammlung des IMV wurde dann aufgrund der Ergebnisse dieser Prüfungen die Anwendung von *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 zum Nachweis von Penicillin und anderen Hemmstoffen in der Milch empfohlen (KAY, 1969).

TERPLAN und ZAADHOF (1969) kamen bei einem Vergleich von *Sarcina lutea*, *B. subtilis* und *B. calidolactis* ebenfalls zu dem Ergebnis, daß der letztgenannte Testkeim weitaus am besten zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch geeignet ist. Sie modifizierten und rationalisierten den Blättchentest (GALESLOOT und HASSING, 1962) nach dem Prinzip der Brabanter-Mastitis-Reaktion zwecks Anwendung für Reihenuntersuchungen (Tablett für 100 Proben). Außerdem entwickelten sie einen Reduktionstest mit *B. calidolactis* und TTC als Indikator im Hinblick auf die inner-

betriebliche Selbstkontrolle. Als Grenzkonzentration für einzelne Antibiotika in dem modifizierten Agar-Diffusionstest wurden nach Inkubation von 3 1/2 bis 4 Stunden bei 68° C im Brutschrank bei gesättigter Wasserdampf-atmosphäre ermittelt: 0,005 IE Penicillin/ml, 2 mcg Dihydrostreptomycin/ml, 0,7 mcg Chlortetracyclin/ml und 25 mcg Chloramphenicol/ml. Der TTC Reduktionstest, der bereits nach 35-45 Minuten Inkubation im Wasserbad ausgewertet werden kann, war noch sensitiver; im Gegensatz zum Agar-Diffusionstest war eine Vorerhitzung der Milchproben jedoch unumgänglich. MATSUMOTO, ZINBO und HARUTA (1969) untersuchten den Einfluß verschiedener Faktoren auf die Ausbildung der Hemmhöfe. Sie kamen u.a. zu dem Ergebnis, daß die Hemmhofgröße mit zunehmender Agar-Konzentration (1 - 1,75 %) des Mediums abnimmt, die Größe der Testblättchen (8, 10 oder 12 mm) jedoch ohne signifikanten Einfluß ist.

MOL (1969) beschrieb ein Verfahren, bei dem nährstofffreier Agar mit isotonischem Salzgehalt und Sporen von *B. calidolactis* sowie nährstoffgetränkte Papierscheibchen (20 % Pepton und 20 % Dextrose) zum Testsystem gehörten. Die Blättchen werden in die zu untersuchende Milch getaucht und anschließend auf den sporenhaltigen Agar gebracht. Diese Methode ist zwar langsamer (Auswertung nach 6 Stunden bei 63° C), jedoch nicht weniger empfindlich als der von GALESLOOT und HASSING (1962) beschriebene Test. Ein großer Vorteil dieses umgekehrten Blättchentestes liegt darin, daß die gebrauchsfertigen Platten selbst bei Zimmertemperatur über einige Zeit gelagert werden können.

VARABIOFF und LOANE (1970), die in Australien die Eignung von *Sarcina lutea* und *B. calidolactis* vergleichend prüften, stellten ebenfalls fest, daß *B. calidolactis* erheblich sensitiver ist. Sie hoben außerdem als Vorteil der von GALESLOOT und HASSING beschriebenen Methode hervor,

daß pH-Werte der Milch zwischen 5,0 und 8,0 ohne Einfluß auf die Größe der Hemmhöfe penicillinhaltiger Milch sind. IWAIDA und TSUGO (1970) wiesen mit Filterblättchen von 8 mm auf Trypton-Glukose Agar bereits bei Mengen über 0,001 IE Penicillin/ml deutliche Hemmungen nach. PACIFICI, AMATO und DRACOS (1970), die Papierblättchen von Whatman als besser geeignet fanden als diejenigen von Schleicher & Schüll bzw. Fabricano, konnten ebenfalls noch 0,001 IE Penicillin/ml nachweisen. In dem 1970 von dem IMV für die Erstellung eines Standards vorgelegten Entwurf wird abweichend von der Originalmethode (GALESLOOT und HASSING) empfohlen, den Agar-Diffusionstest bei pH 8 durchzuführen. Als Testblättchen werden Whatman AA-Scheiben als geeignet angegeben. Von einer Erhitzung der Proben vor dem Ansatz wird abgeraten, da einerseits Penicillin zu einem gewissen Teil abgebaut werden könnte, andererseits aber nicht alle in der Milch natürlich vorkommenden, das Wachstum von *B. calidolactis* hemmenden Substanzen zerstört werden (IMV, 1970 a). Dieser Entwurf wurde bei der Sitzung des IMV in Melbourne gebilligt, so daß noch im gleichen Jahr die Nachweismethode als Standard Nr. 57 publiziert wurde (1970 b).

ZAADHOF (1971) testete neben Plate Count Agar auch Diagnostic Sensitivity Test Agar (DST) und MUELLER-HINTON Agar auf die Eignung als Medium zum Nachweis von Antibiotika-, Sulfonamid- sowie Reinigungs- und Desinfektionsmittelrückständen in der Milch mit *B. calidolactis*. Nach seiner Ansicht ist DST für diese Zwecke am besten geeignet, da die Sensitivität von *B. calidolactis* gegenüber Sulfonamiden sowie Reinigungs- und Desinfektionsmitteln bei Verwendung von Plate Count Agar erheblich herabgesetzt ist, beim Nachweis von Antibiotika jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Medien bestehen. Der Einsatz von MUELLER-HINTON Agar erbrachte keinerlei Vorteile gegenüber Plate Count Agar.

FORSCHNER (1972 a, b, c, d; 1973 a, b) berichtete wiederholt über Möglichkeiten, den Hemmstofftest mit *B. calidolactis* zu modifizieren und rationalisieren. Anstelle des anfänglich eingesetzten Plate Count Agars (TERPLAN und ZAADHOF, 1969) wählte er ein Medium, das in seiner Zusammensetzung dem von KUNDRAT (1968, 1972) beschriebenen nahezu vollständig entspricht und als Indikatoren Bromkresolpurpur und Lackmus-Tinktur enthält. Zum Aufbringen der Milchproben auf den Agar verwendete er zahnradförmig geschnittene achtarmige Sterne aus Filterpapier. Diese Sterne können Arm für Arm in die Milchprobe eingetaucht werden ohne Verwendung von Instrumenten, die einer zwischenzeitlichen Reinigung bedürfen. Der freie Mittelkreis des Zahnrades wird mit zwei Scheibchen beschickt, so daß pro Platte 10 Proben zur Untersuchung gelangen. Bei vergleichenden Untersuchungen (FORSCHNER, 1972 b) zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem beschriebenen System, bei dem die Menge der aufgenommenen Milch durch Auftragen einer Paraffinlösung auf die Arme auf ca. 0,03 ml standardisiert wurde, und dem BRT. Im Gegensatz zum BRT, der wegen der reduktionsabhängigen Beurteilung an "perfektionistisch einzuhaltende Zeitabläufe" gebunden sei, könne beim Agar-Diffusionstest - in konventioneller Form oder entsprechend den Vorschlägen von TERPLAN und ZAADHOF (1969) bzw. FORSCHNER (1972) - auf diese enge Zeitabhängigkeit zugunsten "optimaler organisatorischer Abläufe" verzichtet werden (FORSCHNER, 1973 a). Durch Einsatz von zehnarmligen Teststernen mit definierter Saugkapazität (25 mg) gelang es, die anfänglichen Nachteile (erhöhter Arbeitsaufwand infolge Auflegens zweier zusätzlicher Blättchen, keine semiquantitative Aussage wegen teilweise erheblichen Differierens der vom Filterpapier aufgesaugten Probenmengen) abzustellen (FORSCHNER, 1973 a). Als Medium wurde schließlich zugunsten einer Systemoptimie-

rung Antibiotic Medium Nr. 1 vorgeschlagen und auch auf die im Nährboden nach KUNDRAT enthaltenen Indikatoren verzichtet, zumal diese keine zusätzlichen Informationen erbrachten. Zur Kontrolle des gesamten Testsystems werden mit 1,5 mcg Tetracyclin/ml getränkte Blättchen aufgelegt. Diese Blättchen müssen einen Hemmhof von mindestens 2 mm erbringen. Bei Durchführung des Testes in der vorgeschlagenen Form ergeben sich nach FORSCHNER (1973 a) folgende Nachweisgrenzen für wäßrige antibiotische Lösungen: 0,004 IE Penicillin/ml, 6 mcg Streptomycin/ml, 1 mcg Tetracyclin/ml und 10 mcg Chloramphenicol/ml (Die Lösung der Antibiotika in Milch ließ die Grenzwerte geringgradig ansteigen). Sulfonamide waren in den aus therapeutischen Anwendungen zu erwartenden Größenordnungen nicht nachweisbar. Als besonderer Vorteil wurde von FORSCHNER (1972) die mit diesen Sternen außerordentlich leicht zu bewerkstelligende Stabilisierung von Untersuchungsmaterial herausgestellt. Von der Tatsache ausgehend, daß Wasserentzug ohne feststellbaren Einfluß auf die antibiotische Aktivität bleibt, Keimvermehrung und biochemische Veränderungen im Untersuchungsmaterial jedoch weitestgehend verhindert werden, empfiehlt FORSCHNER bei Bedarf eine Lufttrocknung der mit dem Untersuchungsmaterial getränkten Sterne. FORSCHNER (1972 c) wies auch darauf hin, daß insbesondere Keime aus der Proteus- und Fluoreszentengruppe sowie coliforme Keime und auch Hefen bei längerer Einwirkung auf das Probenmaterial sowohl falsch-negative Ergebnisse (durch Überdeckung vorhandener Hemmhöfe) als auch falsch-positive Ergebnisse (durch bakteriell bedingte Abbauprodukte des Untersuchungsmaterials) produzieren. Diese Störungen treten insbesondere bei versandten Proben während der wärmeren Jahreszeit auf, auch wenn diese nach der von HEESCHEN et al. (1969) empfohlenen Methode stabilisiert wurden (FORSCHNER, 1973 a). So reagierten Proben, bei denen einerseits das

in dem erwähnten Konservierungsmittel enthaltene Methylenblau entfärbt war und andererseits Hemmstoffe nachgewiesen wurden, sofort nach Verdünnung (1:100 in hemmstofffreier Sterilmilch) negativ und nach einer sich anschließenden Bebrütung von 5 - 7 Stunden bei 37° C wieder positiv. Es handelte sich hierbei um eine mikrobiell bedingte Hemmung, nicht aber um eine solche durch Antibiotika (FORSCHNER, 1973 b). Auffällig war, daß die Einzelkomponenten der Keimgemische im Gegensatz zur ursprünglichen Mischflora (insbesondere Steptokokken, coliforme Keime und Fluoreszenten) nur z.T. in der Lage waren, Hemmaktivitäten zu provozieren.

BUCHMANN (1972) und HENTSCHKE (1972) bestätigten im letzten Jahr erneut die Überlegenheit von *B. calidolactis* im Vergleich zu *B. subtilis* beim Nachweis von Hemmstoffen in der Milch.

TERPLAN et al. (1973) deuteten eine Möglichkeit an, mit Hilfe einer Dialysiermembran zwischen Antibiotikarückständen und anderen nicht diffusiblen Hemmstoffen (z.B. mikrobiellen Ursprungs), die falsch-positive Ergebnisse bewirken, zu differenzieren. Die Eignung der Methode wurde u.a. an Antibiotikareinsubstanzen sowie an Milch und Milcherzeugnissen überprüft.

2.2.2. Brillantschwarz-Reduktionstest

KRAACK und TOLLE (1967) wandelten den Agardiffusionstest (GALESLOOT und HASSING, 1962) dahingehend ab, daß das Wachstum der Keime nicht direkt sondern indirekt erfaßt wird anhand des zugesetzten Brillantschwarz (Redoxindikator), das beim Wachstum von *B. stearrowthermophilus* var. *calidolactis* reduziert wird. Dieser Redoxindikator und Lebensmittelfarbstoff Brillantschwarz ist ein violett-blaues, in Wasser leicht lösliches Pulver; die Oxidations-

stufe ist blauviolett, die Reduktionsstufe bräunlichgelb (ROEMPP, 1962). Bei dem von KRAACK und TOLLE (1967) beschriebenen Verfahren (Brillantschwarz-Reduktionstest = BRT) wird ein Gemisch aus Nähragar, Sporen von *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* und Indikator in Vertiefungen von Einwegtablets aus transparentem Kunststoff (Mikrotiter-Tablets) gefüllt. Die zu untersuchende Milch wird jeweils in eine Vertiefung zupipettiert, die Tablets werden anschließend für zwei Stunden zwecks Diffusion evtl. vorhandener Hemmstoffe in den Kühlschrank gebracht. Nach Entfernung der Milch werden die Tablets 2 1/2 bis 2 3/4 Stunden im Wasserbad bei 55° C bebrütet. Obengenannte Autoren geben folgende Nachweisgrenzen an: 0,006 IE Penicillin/ml, 8 mcg Dihydrostreptomycin bzw. 0,8 mcg Chlortetracyclin/ml Milch.

Später verwendeten KRAACK und TOLLE (1969) anstelle des Plate Count Agar "Antibiotika Agar Nr. 1" (GROVE und RANDALL Medium Nr. 1). Dieser Agar zeichnet sich durch hohen Reinheitsgrad und günstige Diffusionseigenschaften aus. Gleichzeitig wurde die Testkeimkonzentration erhöht. Hierdurch wurde es möglich, die Gesamttestzeit auf drei Stunden zu reduzieren im Gegensatz zu dem 1967 beschriebenen Verfahren, bei dem die Gesamttestzeit 4 1/2 bis 5 Stunden betrug. Die Nachweisgrenzen liegen bei 0,007 - 0,008 IE Penicillin, 10 mcg Streptomycin bzw. 0,7 mcg Chlortetracyclin pro ml Milch. Diese Werte wurden von KLEINSCHROTH und KRAACK (1969) bestätigt, die einen technisch abgewandelten BRT beschrieben (Test in einzelnen Röhrchen zwecks Einsatzes der Ausrüstung für die Brabanter Mastitis-Reaktion). In vergleichenden Untersuchungen beobachteten TERPLAN und ZAADHOF (1969), daß der BRT gegenüber dem herkömmlichen Agar-Diffusionstest einige Nachteile aufweist. Diese ergaben sich dadurch, daß einerseits stark keimhaltige Milchproben trotz Anwesenheit von Penicillin eine Reduktion hervorriefen

(falsch-negativ) und andererseits der BRT positiv ausfiel, obwohl der empfindlichere Agar-Diffusionstest negativ war. Hinzu kommt nach Ansicht o.a. Autoren, daß bei einer Überschreitung der angegebenen Bebrütungszeit im Gegensatz zum Agardiffusionstest konventioneller Form trotz Vorhandensein von Hemmstoffen eine Reduktion des Brillantschwarz stattfinden kann und schließlich das Ergebnis weniger gut quantifizierbar ist als bei Vorliegen von Hemmhöfen. Letztere lassen eine Aussage hinsichtlich des Hemmstoffgehaltes zumindest als Äquivalent gegenüber einer Testsubstanz zu.

OBIGER (1970) verwendete von der Firma "Enterotox" vertriebene BRT-Tabletts, mit denen nach Angabe des Herstellers 0,003 IE Penicillin/ml Milch sicher nachweisbar sein sollen. OBIGER wies bis zu 0,001 IE Penicillin, 1 mcg Ampicillin, 1 mcg Dihydrostreptomycin, 1 mcg Chloramphenicol, 1 mcg Chlor- bzw. Oxytetracyclin pro ml Milch nach. Diese Angaben finden sich jetzt auch als Nachweisgrenzen in der Gebrauchsanweisung des Laboratorium "Enterotox". Von sieben Sulfonamid-Präparaten vermochten nur fünf in der Dosierung von 1 mg/ml einen deutlichen Hemmeffekt auszuüben, bei einer Verdünnung auf 0,1 mg wurden die Reaktionen zweifelhaft oder negativ. Bei den beiden anderen Sulfonamiden war die Reaktion bereits bei 0,1 mg fraglich bzw. negativ. Von 13 Reinigungs- und Desinfektionsmitteln übten vier (1 %ige Wirkstoffkonzentration) keine Hemmwirkung aus und nur noch zwei Präparate riefen in einer Konzentration von 0,1 % deutliche Hemmung hervor. Bei 0,05 % war kein eindeutig positives Ergebnis mehr ablesbar. Aufgrund dieser Ergebnisse hält OBIGER (1970) *B. calidolactis* für den Nachweis von Sulfonamid- sowie Reinigungs- und Desinfektionsmittelrückständen in der Milch für zu wenig empfindlich. Als Nachteil der kommerziell vertriebenen Testtabletts sieht OBIGER außerdem die zeitlich begrenzte Verwendbarkeit - garan-

tiert wurden damals 20 Tage, jetzt (vermutlich aufgrund der von Obiger festgestellten zweifelhaften bzw. ausbleibenden Reaktionen schon vor Ende dieser Frist) 14 Tage - weiterhin falsch-positive Ergebnisse (ca. 3 %) infolge Versagens des Reaktionsgemisches in den einzelnen Kavitäten sowie zweifelhafte Ergebnisse (ca. 3 %) bei frischen Tabletts. Daß bei Sulfonamiden und Desinfektionsmitteln eine sehr hohe Konzentration zur Erlangung einer Hemmwirkung im BRT notwendig ist, wurde von KRAACK und REICHMUTH (1971) bestätigt. Diese Autoren gaben außerdem an, daß bei Keimzahlen von 5×10^7 bis 1×10^8 /ml von einigen in der Milch vorkommenden Keimarten thermostabile (5 Minuten 80°C) Hemmstoffe gebildet werden. Mit Milchsäure bis auf pH 5,4 eingestellte hemmstofffreie Milch mit 10^5 Keimen/ml erbrachte stets negative Resultate. Die bei Routineuntersuchungen festgestellten Hemmungen mit einem pH unter 5,4 und einer Keimzahl von ca. $2,7 \times 10^7$ /ml Milch wurden daher nach Ansicht von KRAACK und REICHMUTH durch bakterielle Stoffwechselprodukte bedingt. Zur Ausschaltung solcher unspezifischen Reaktionen sollten nach Ansicht o.a. Autoren Milchproben mit über 9×10^6 Keimen/ml bzw. mit einem pH unter 6,0 nicht berücksichtigt werden. BRUNN (1971) hat u.a. die Eignung der kommerziell vertriebenen BRT-Tabletts mit derjenigen eines aus dem gleichen Medium (pH 6,6) hergestellten konventionellen Agar-Diffusionsmedium (mit Blättchen) verglichen. Er registrierte positive Ergebnisse im BRT (bzw. Agar-Diffusionstest) bei folgenden Konzentrationen: 0,004 IE (0,009 IE) Penicillin G-Natrium, 2 mcg (30 mcg) Chloramphenicol, 1 mcg (10 mcg) Chlortetracyclin, 3 mcg Oxytetracyclin und 10 mcg (35 mcg) Streptomycin pro ml Milch. Bei Testung erhitzter Milch waren für eindeutige positive Reaktionen teilweise höhere Konzentrationen erforderlich. Neben der schlechteren Sensibilität des Blättchentestes fiel auch die

längere Bebrütungszeit (6 - 8 Stunden gegenüber 3 Stunden im BRT) auf.

Nach FORSCHNER (1972 d), der den BRT vergleichend mit dem von ihm modifizierten Agar-Diffusionstest verglich, liegen die Nachweisgrenzen bei den kommerziell vertriebenen BRT-Tabletts bei etwa folgenden Größen: 0,01 IE Penicillin/ml, 10 mcg Chloramphenicol/ml, 10 mcg Streptomycin/ml, 10 mcg Tetracyclin/ml.

2.3. Einfluß der Erhitzung auf die Stabilität von Antibiotika

Über den Einfluß der Erhitzung auf die Stabilität von Antibiotika bestehen nicht immer einheitliche Auffassungen, obwohl aus der Mehrzahl der Untersuchungsergebnisse zu ersehen ist, daß die Antibiotika relativ hitzestabil sind. Die Differenzen sind teils durch unterschiedliche Beschaffenheit der Substanzen - auch hinsichtlich Reinheitsgrad - teils durch differierende Nachweisverfahren bedingt. Zusammenfassende Angaben finden sich u.a. in den Arbeiten von OVERBY (1954) und LUKASS (1971).

FOSTER und WOODRUFF (1943) beobachteten, daß Penicillin in Bouillon durch 30minütige Erhitzung bei 65° C 5-30 % an Aktivität verlor. SHAHANI et al. (1956) berichteten, daß in Wasser (pH 6,6) bzw. in 1 %igem Phosphatpuffer (pH 6,0) gelöstes Penicillin nach 30 Minuten bei 61,6° C zu 54,7 % bzw. 28,9 % zerstört war, nach 30 Minuten bei 71,1° C zu 100 % (Wasser) bzw. 34 % (Puffer) und nach 15 Minuten bei 121,1° C bei beiden Medien zu 100 %. PILET und TOMA (1969) ermittelten folgende Inaktivierungsraten von Penicillin in Wasser (pH 5,4)

bzw. Bouillon (pH 7,0) bei Erhitzung auf 100° C: 50 % bzw. 35 % bei 0,25 bis 0,06 mcg/ml nach 30 Minuten; 75-85 % bzw. 65-75 % nach 60 Minuten und 85-95 % bzw. 88 % nach 90 Minuten.

Wenn Penicillin nicht in Wasser oder Puffer gelöst war, sondern in Milch, waren durchweg höhere Temperaturen oder längere Einwirkungszeiten erforderlich, um ähnliche Effekte zu bewirken. WATTS und McLEOD (1946) fanden, daß Penicillin bei einer Erhitzung von Milch auf 100° C nach 15 Minuten noch unverändert war, nach 30 Minuten zu 50 % und nach 60 Minuten zu 75 % zerstört war. PILET und TOMA (1969), die den Einfluß der gleichen Temperatur nach 30, 60 bzw. 90 Minuten prüften, berichteten, daß 20 %, 50 % bzw. 85 % des zugesetzten Penicillins (Konzentration 0,25 bis 0,6 mcg/ml) inaktiviert waren. SHAHANI et al. (1956) gaben an, daß Penicillin nach 30 Minuten bei 71,1° C 10,1 % oder nach 15 Minuten bei 121,1° C 59,7 % seiner Aktivität eingebüßt hatte. WODSAK (1959) war bei seinen Untersuchungen zu dem Ergebnis gekommen, daß beim Sterilisieren (120° C) 30-60 % Penicillin inaktiviert werden. Vom INTERNATIONALEN MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND (1967) wurde darauf hingewiesen, daß bei einer Erhitzung auf 90° C über 30 Minuten 20 % des Penicillins zerstört werden, bei Sterilisieren oder Kochen der Milch 50 %.

KATZNELSON und HOOD (1949), DOAN (1950), KRIENKE und FOUTS (1950) sowie TREMBATH (1950) kamen zu dem Ergebnis, daß es bei den zur Pasteurisierung von Milch angewendeten Temperaturen - auch nach etwas längerer Einwirkzeit - zu keiner nachweisbaren Zerstörung des Penicillins kommt. Ähnliches berichteten auch JEPSEN und OVERBY (1951), PEDERSEN und MØLLER-MADSEN (1951), BERTELSEN (1952), WODSAK (1959) und HAUKE (1968). LANG (1967) gab an, daß es durch die Hitzeinaktivierung bei 80° C im Falle der Säuerungsprobe mit Lackmus bzw. 85° C im Falle der

Methylenblauprobe nach FRANK (1965) zu keiner Zerstörung des Penicillins kommt, die sich auf das Ergebnis der beiden Nachweisverfahren nachteilig auswirken könnte. Im Gegensatz dazu beobachtete HUNTER (1949) bei der Pasteurisierung (30 Minuten bei 61,6° C) einen Aktivitätsverlust von 0-11 %. Während von WATROUS et al. (1962), SHAHANI et al. (1956) bzw. vom INTERNATIONALEN MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND (1967) eine Inaktivierungsrate bei der Pasteurisierung von 9,5 %, 8,2 % bzw. 8 % genannt wurde, beschrieb BECKER (1966) eine solche von 75 % - 88 %. Weitere Angaben über die Inaktivierung von Penicillin bei unterschiedlichen Zeit/Temperaturkombinationen sind in der Publikation von HAUKE (1968) in Form einer tabellarischen Übersicht zu finden.

Der Einfluß der Erhitzung wurde auch bei den anderen in der Veterinärmedizin gebräuchlichen Antibiotika (Streptomycin, Tetracycline, Chloramphenicol) von verschiedenen Seiten geprüft. In Übersicht 2 sind einige der dabei erzielten Daten zusammengefaßt, aus denen hervorgeht, daß Streptomycin und Tetracycline etwas hitzelabiler als Penicillin sind, Chloramphenicol jedoch erheblich stabiler.

Übersicht 2: Einfluß einer Erhitzung auf die Aktivität von Streptomycin, Tetracyclinen und Chloramphenicol

Antibiotikum	Medium	Temperatur(°C) / Zeit(min)		Verlust an Aktivität (%)	Fundstelle
Streptomycin	Milch	80	Moment	0	OVERBY (1952)
	Milch	61,6	30	14,8 - 19,1	SHAHANI et al. (1954/55)
	"	71,1	30	22,8	
	"	121,1	15	100	
	Milch	81 - 86	1,5/1,7	ca. 10	HAUKE (1968)
	"	Kurzzeit / Hoherhitzung		0	
Dihydrostreptomycin	Milch	100	30	66	IMV (1967)
	wäßrige Lösung	70	30	0	WALTER und HELLMAYER (1969)
	"	100	10	50	
	Milch	61,6	30	8,6 - 13,6	SHAHANI et al. (1954/55)

Antibiotikum	Medium	Temperatur(°C) / Zeit(min)	Verlust an Aktivität (%)	Fundstelle
Chlortetracyclin	Milch	63 30	0	KATZNELSON und HOOD (1949)
	"	88 60	0	
	"	121 15	0	
	Milch	80 Moment	0	OVERBY (1952)
	Milch	61,6 30	11,5	SHAHANI et al. (1954/55)
	Wasser	61,6 30	32,2	
	0,01 m Puffer pH 4,7	61,6 30	16,2	
	Milch	61,6 30	16,6	SHAHANI (1957)
	"	71,1 30	27,6	
	"	121,1 15	100	
	Wasser	61,6 30	32,5	SHAHANI (1957)
	"	71,1 30	51,2	
	"	121,1 15	100	
	0,01 m Puffer pH 4,7	61,6 30	24,2	
		71,1 30	34,3	
		121,1 15	100	

Antibiotikum	Medium	Temperatur(°C) / Zeit(min)	Verlust an Aktivität (%)	Fundstelle
Chlortetracyclin	Milch (0,000125)	62,8 71,1 82,2	30 5 5	44,3 100 100
	Milch (0,01 mg/ml)	62,8 71,1 82,2	30 5 5	53,2 53,2 27,6
	Milch (66,5 mg/ml)	62,8 71,1 82,2	30 5 5	0 0 0
	Milch	90	30	90
	wäßrige Lsg. pH=1	100	2,1	50
	wäßrige Lsg. pH=13	100	0,3	50
	Milch "	100 100	30 60	50 65
				IMV (1967)
				WALTER und HEIL- MEYER (1969)
				PILET und TOMA (1969)

WATROUS et al.
(1962)

Antibiotikum	Medium	Temperatur(°C) / Zeit(min)	Verlust an Aktivität (%)	Fundstelle
Chlortetracyclin	Milch	100 90	80 - 100	PILET und TOMA (1969)
		100 180	100	
	Aqua dest. (pH 5,4)	100 60	100	
	BOUILLON (pH 7,0)	100 60	100	
Oxytetracyclin	Milch	80 Moment	0	OVERBY (1952)
	Milch	61,6 30	23,6	SHAHANI (1958)
		71,1 30	35,6	
	Puffer pH 4,7	61,6 30	32,4	
		71,1 30	48,4	
	Wasser	61,6 30	41,4	
		71,1 30	66,4	
	Milch 0,001 mg/ml	62,8 30	32,6	
		71,1 5	48,1	
		82,2 5	48,1	
	Milch 0,3 mg/ml	62,8 30	8,6	WATROUS et al. (1962)
		71,1 5	16,5	
		82,2 5	16,5	

Antibiotikum	Medium	Temperatur(°C) / Zeit(min)	Verlust an Aktivität (%)	Fundstelle
Oxytetracyclin	Milch	100 30	90	IMV (1967)
	Milch	73 - 86 1,3-1,7	ca. 20	HAUKE (1968)
	"	Kurzzeit / Hoherhitzung	0	
	Milch	100 15	75 - 100	PILET und TOMA (1969)
		100 30	100	
	Aqua dest. pH 5,4	100 15	80 - 100	
		100 30	100	
Chloramphenicol	Bouillon pH 7,0	100 15	100	WALTER und HEILMEYER (1969)
	wäßrige Lsg. pH=1	100 4,5	50	
	wäßrige Lsg. pH=13	100 2,2	50	OVERBY (1952)
	Milch	80 Moment	0	
	wäßrige Lösung	100 60	0	OBERZILL (1962)
	Milch	völlig resistent		IMV (1967)
	wäßrige Lösung	100 5 Std.	0	WALTER und HEILMEYER (1969)

2.4. Unspezifische Hemmstoffe in der Milch

In vielen Veröffentlichungen über das Vorkommen von Hemmstoffen in Milch wird auch darauf hingewiesen, daß sog. milcheigene Inhibine eine wesentliche praktische Bedeutung bei der Durchführung des Hemmstofftests und der Herstellung fermentativer Milcherzeugnisse besitzen. An dieser Stelle soll nur auf einige wesentliche Punkte hingewiesen werden, weitergehende Informationen können u.a. den umfangreichen Publikationen von DREWES (1927), JONES und SIMMS (1930), GEORGAKIS (1962), AUCLAIR (1964), MEEDER (1964), WAGNER (1965), BUSTA (1966), REITER und ORAM (1967), REITER (1968) sowie ZEITRÄG (1970) entnommen werden.

Als erster hat FOKKER (1890) die Bakterizidie roher Milch beschrieben. Bei Beimpfung sterilisierter bzw. roher Milch mit Milchsäurekulturen kam sterilisierte Milch erheblich schneller zur Gerinnung. Er folgerte daraus, daß rohe Milch "zerstörende Eigenschaften" auf die inokulierten Kulturen ausübt. Ähnliches ermittelten u.a. auch DREWES (1927), JONES und SIMMS (1930) sowie GEORGAKIS (1962). Nach BRUNSCHWILER (1961) kann der Hemmeffekt frischer Rohmilch einem Penicillingehalt von 0,5 IE/ml entsprechen. JONES und SIMMS gaben dem in der Rohmilch vorhandenen, das Wachstum von Streptokokken hemmenden Prinzip den Namen "Lactenin". Diese Substanz konnte zwar in hochgradig gereinigtem Zustand isoliert, nicht jedoch identifiziert werden. Als festgestellt wurde, daß die Milch verschiedene in ihrer bakteriellen Spezifität differierende milcheigene Hemmstoffe enthält, wurden diese als L_1 (Agglutinin, das für die natürliche Aufrauhung der Milch verantwortlich ist), L_2 (Lactoperoxidase) und L_3 (spezifische Antikörper) bezeichnet (AUCLAIR, 1964). Von REITER und ORAM (1967) wurde

später vorgeschlagen, auf die Bezeichnung "Lactenin" zu verzichten, da diese Substanzen nicht ausschließlich in Milch vorkommen. Die genannten Autoren teilten die hemmenden Systeme folgendermaßen ein: Lactoperoxidase/Thiozyanat/Peroxyd; Xantinoxidase; Lactotransferrin; Komplemente und Antikörper; Leukocyten und Mastitis. Da hierüber wie auch über andere in der Milch vorhandene, das Wachstum von Mikroorganismen hemmende Prinzipien - z.B. MEEWES und MILOSEVIC (1954) sowie OVERBY (1954): erhöhter Keimgehalt, OVERBY (1954) und OBIGER (1963): Stoffwechselprodukte bestimmter Streptokokken, MAXCY und CHANDAN (1962): Caprinsäure, SEELEMANN und OBIGER (1963) sowie ZEITRÄG (1970): aus Futterpflanzen stammende Hemmstoffe, MEEDER (1964): Hormone und Fermente - wiederholt im deutschen Schrifttum referiert wurde, soll hier nur in soweit näher darauf eingegangen werden, als es die Hemmung von *B. stearothermophilus* betrifft. Verschiedene Untersuchungen (FRANKLIN, WILLIAMS und CLEGG, 1958; CHEESEMANN und JAYNE-WILLIAMS, 1964) haben ergeben, daß Milch einen hitzestabilen, auch in ultra-hocherhitzter Milch noch nachweisbaren Hemmstoff gegenüber *B. stearothermophilus* enthält, der durch Trypsin inaktiviert, bzw. durch FeSO_4 und weniger stark durch MgSO_4 in seiner Aktivität beeinflußt wird. Die Hemmstoffkonzentration war in normaler Kuhmilch gering, zeigte jedoch einen stetigen Anstieg während der Trockenperiode. Dieser Hemmstoff wurde als das rote eisenbindende Protein Lactotransferrin identifiziert (REITER und ORAM, 1967). Gereinigtes Lactotransferrin verursacht eine Hemmung von *B. stearothermophilus* auf Nähragar, die Hemmwirkung kann jedoch durch Fe^{2+} Ionen aufgehoben werden. Es konnte weiter festgestellt werden, daß ungesättigtes Lactotransferrin keine Wirkung auf die Aktivität von *B. stearothermophilus*-Sporen ausübt, sondern nur ihr Auskeimen hemmt (REITER, 1968). Der Hemmstoff des in

der Trockenperiode gebildeten Sekrets, der mittels Gel-Filtration und Elektrophorese gereinigt wurde, enthielt als aktive Komponenten Lactotransferrin und Casein. Da das Casein selbst keine Hemmwirkung auf *B. stearothermophilus* ausübt und die hemmenden Eigenschaften der aktiven Fraktion durch Fe^{2+} Ionen aufgehoben werden, hat es den Anschein, daß die aktiven Komponenten in Milch und Sekret der Trockenperiode hochmolekulare Lactotransferrin enthaltende Komplexe sind (REITER, 1968). ASHTON und BUSTA (1968) fanden demgegenüber, daß einige Stämme von *B. stearothermophilus* auch durch Natriumcaseinat gehemmt werden. Die Hemmung durch Milch war unabhängig vom Laktationsstadium und nahm mit steigendem Eiweißgehalt zu. Der Hauptanteil des hemmenden Prinzips verblieb in der säureunlöslichen (pH 4,6) Eiweißfraktion. Weitere Untersuchungen von ASHTON, BUSTA und WARREN (1968) zeigten, daß durch das Natriumcaseinat ein Eisenmangel bewirkt wurde, der für die Wachstumshemmung von *B. stearothermophilus* verantwortlich ist.

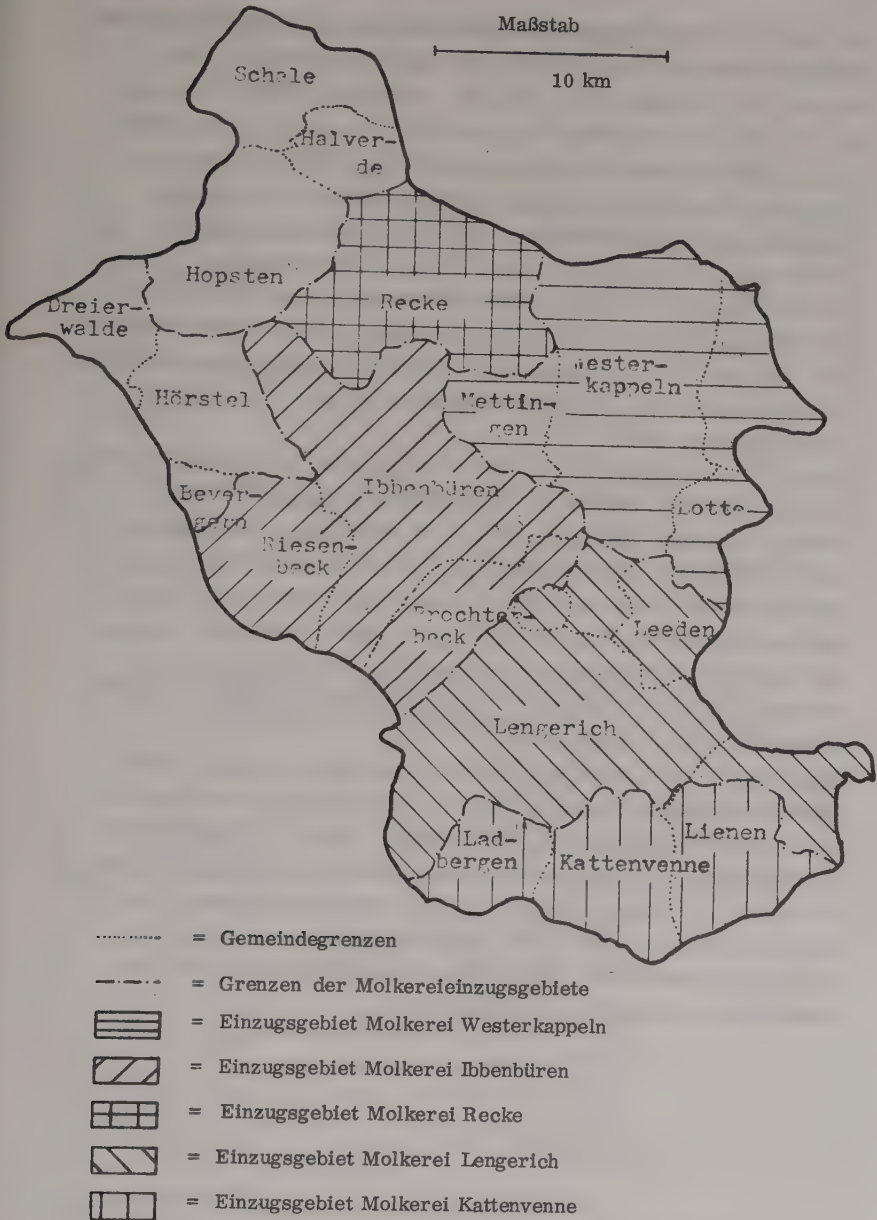
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. M a t e r i a l

Tabelle 1: Übersicht über die in den Einzugsbereichen
von fünf Molkereien des Landkreises Tecklen-
burg entnommenen Milchproben

Monat	In den Molkereien entnommene Probenzahlen					
	Wester- kappeln	Ibben- büren	Recke	Lenge- rich	Katten- venne	ins- gesamt
Dez.70	255	284	284	155	392	1370
Jan.71	0	387	292	576	0	1255
Feb.71	480	192	195	0	488	1355
März 71	384	984	192	0	383	1943
April 71	195	192	296	296	491	1470
Mai 71	491	195	296	0	195	1177
Juni 71	288	391	195	385	103	1362
Juli 71	0	489	291	196	0	976
Aug. 71	390	95	0	195	195	875
Sept. 71	390	195	0	195	195	975
Okt. 71	0	705	105	195	192	1197
Nov. 71	0	0	0	0	192	192
Dez. 71	0	0	194	0	0	194
Jan. 72	192	192	192	0	0	576
Feb. 72	192	0	0	0	192	384
März 72	0	192	192	192	0	576
April 72	0	0	100	192	0	292
Mai 72	0	189	0	0	96	285
Aug. 72	0	0	198	0	0	198
Sept. 72	96	0	176	0	0	272
Jan. 73	197	0	0	0	0	197
total	3550	4682	3198	2577	3114	17 121

Abbildung 1: Der Landkreis Tecklenburg (811.10 qkm) mit den Einzugsgebieten der einzelnen Molkereien



In der Zeit von Dezember 1970 bis einschließlich Mai 1972 sowie im August/September 1972 und Januar 1973 (Tab. 1) wurden an insgesamt 110 Tagen - monatlich fünf bis zehn Mal - jeweils zwischen 87 und 296 Anlieferungsmilchproben im Einzugsgebiet der im Landkreis Tecklenburg gelegenen Molkereien Westerkappeln, Ibbenbüren, Recke, Lengerich und Kattenvenne (Abb. 1) entnommen und im Labor des Veterinäramtes des Kreises Tecklenburg auf die Anwesenheit von Hemmstoffen untersucht. Die Gesamtzahl der Proben betrug 17 121. Hinsichtlich der Verteilung der Proben auf die einzelnen Untersuchungsmonate und die verschiedenen Molkereien ergaben sich die in Tabelle 1 aufgeführten Werte.

Diesen Molkereien wurden 1971 insgesamt 60.320.706 kg Milch (Tab. 2) von 3653 Erzeugern angeliefert. Ibbenbüren nahm von ihnen mit über 17.000.000 kg am meisten an, Recke mit ca. 8.000.000 kg am wenigsten. Bei dem Einzugsgebiet der erwähnten Molkereien handelt es sich um ein Gebiet, in dem überwiegend Landwirtschaft betrieben wird. Die Bodenwerte werden mit 28 (Lengerich, Kattenvenne), 30 (Recke), 32 (Ibbenbüren) und 35 - 40 (Westerkappeln) angegeben.

Mehr als 85 % der viehhaltenden Betriebe hatten 1971 nicht mehr als 10 Milchkühe, in 55,6 % der Betriebe waren sogar nur bis zu 5 Milchkühe (Tab. 3). Infolgedessen war auch der Anteil der Betriebe mit über 20 Tieren mit 2,3 % sehr klein. Im Mai werden die Kühe üblicherweise auf die Weide ausgetrieben, der Eintrieb erfolgt im Oktober. Einige Bestände sind auch zu ganzjähriger Stallhaltung übergegangen.

Tabelle 2: Den Molkereien des Landkreises Tecklenburg
(außer Hörstel und Hopsten) 1971 angelieferte
Milch (kg)

Molkerei	Menge der angelieferten Milch (kg)
Westerkappeln	12.703.643
Ibbenbüren	17.040.524
Recke (Wierlemann)	7.939.478
Lengerich	13.497.000
Kattenvenne	9.040.061
INSGESAMT	60.220.706

Tabelle 3: Übersicht über die Größe der Milchvieh-
bestände im Landkreis Tecklenburg (1971)

Bestandsgröße Milchvieh	Anzahl der Betriebe
1 - 5	2021 (55,6 %)
6 - 10	1128 (30,9 %)
11 - 15	318 (8,8 %)
16 - 20	99 (2,4 %)
21 - 30	54 (1,4 %)
über 30	33 (0,9 %)
insgesamt	3653 (100 %)

Für die Untersuchungen wurden jeweils morgens 20 ml entweder bei der Anlieferung der Milch an die Molkereien aus Kannen mit einem Stechheber, der zwischendurch stets gut abgespült wurde, entnommen oder an den Tankwagen während des Absaugens der Milch aus den Hoftanks der Milchlieferanten abgezweigt. Die Proben wurden in sterile Reagenzgläschen gefüllt, die mit einem Gummistopfen verschlossen und gekennzeichnet wurden. Die Untersuchung der gekühlten Proben im o.a. Labor erfolgte 2 - 3 Stunden nach der Entnahme.

3.2. Methodik

Für den Nachweis der antibiotisch wirksamen Substanzen kamen verschiedene Verfahren mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* als Testkeim zum Einsatz, und zwar der Brillantschwarz-Reduktionstest (KRAACK und TOLLE, 1967, 1969), der Agardiffusionstest mit Plate Count Agar (PC) als Nährmedium (GALESLOOT und HASSING, 1962; INTERNATIONALER MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND, 1969; TERPLAN und ZAADHOF, 1969) und der Agardiffusionstest mit Diagnostic Sensitivity Test Agar (DST) als Nährmedium (ZAADHOF, 1971). Während mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest und dem Agardiffusionstest mit PC alle 17.121 Proben untersucht wurden, wurden mit dem DST, der erst ab März 1971 parallel zu den beiden anderen Verfahren mitlief, nur 13.141 Proben getestet.

3.2.1. Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT)

Zur Verwendung kamen gebrauchsfertige Brillantschwarz-Reduktionstest-Testtablets der Firma "Laboratorium Enterotox", Kempen. Laut Herstellerangabe konnten die Tablets früher maximal 20 Tage (heute jedoch nur 14 Tage) bei Temperaturen zwischen 2° und 4° C gelagert werden. Nach Entfernung der Klebefolien von den Mikrotitertablets, die sog. Reaktionssysteme für insgesamt 96 Proben enthalten, wurden 94 dieser Reaktionssysteme mit jeweils 0,1 ml der zu untersuchenden Milchproben mittels einer Mikropipette (Marburg 100 µl) überschichtet. Als positive Kontrolle diente stets ein Penicillinstandard mit 0,007 IE/ml (Penicillin G -Natrium, aufgelöst und verdünnt mit sterilem Aqua dest. sowie vermischt mit hemmstofffreier Milch), als negative Kontrolle eine hemmstofffreie Milch (in sterilem Aqua dest. gelöstes hemmstofffreies Magermilchpulver).

Die mit Milchproben und den beiden Kontrollen beschickten Tablets wurden unverschlossen für eine Stunde zur Diffusion vorhandener antibiotisch wirksamer Substanzen in den Kühlschrank (2° - 4° C) gestellt. Anschließend wurden Milch und Kontrollen durch starkes Schwenken aus den Reaktionssystemen entfernt und diese mit Aqua dest. vier Mal abgespült. Zum Trocknen der Reaktionssysteme wurden die Tablets umgekehrt auf Fließpapier gelegt. Anschließend wurden die Tablets mit Folie verschlossen. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden im Wasserbad bei einer Temperatur von 60° C. Dazu wurden die Mikrotitertablets auf ein Stativ gestellt und mit der Unterseite 2 - 3 mm in das Wasserbad eingetaucht. Die blau gefärbten Reaktionssysteme mit mindestens der Farbe des Penicillin-Milch Standards wurden als positiv gewertet, die helleren und gelben Reaktionssysteme als negativ.

Von allen positiven Proben wurde erneut Milch entnommen. Diese wurde für 5 Minuten bei 80° C im Wasserbad erhitzt und anschließend im BRT auf die Anwesenheit hitzestabiler Hemmstoffe getestet.

3.2.2. Agardiffusionstest mit Plate Count Agar (PC) als Nährmedium

Der Agardiffusionstest wurde nach dem von GALESLOOT und HASSING (1962) beschriebenen und vom INTERNATIONALEN MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND (1969) empfohlenen Verfahren in Anlehnung an die von TERPLAN und ZAADHOF (1969) erwähnte Methodik durchgeführt.

Um die Testkultur zu gewinnen, wurden Schrägagarröhrchen mit Nähragar (Oxoid, CM 3) von der Stammkultur *B. stearo-thermophilus* var. *calidolactis* (C 953) mit einer ausgeglühten Platinöse beimpft und 12 - 24 Stunden bei gesättigter Wasserdampf-atmosphäre im Brutschrank bei 67° C bebrütet. Sofern die Röhrchen mit der Testkultur nicht anschließend verwendet wurden, wurden sie durch Eintauchen des Stopfens in Paraffin luftdicht verschlossen und bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt. Vor der Herstellung der Testnährböden wurden Röhrchen mit Testkultur jeweils mit je 10 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. 15 ml der so gewonnenen Keimsuspension wurden darauf mit 200 ml zuvor aufgelösten Plate Count Agar (Oxoid, CM 325) bei einer Temperatur von 55° - 60° C sorgfältig vermischt. Anschließend wurden jeweils 20 ml dieses Nährboden-Testkultur-Gemisches in auf einer waagerechten Fläche stehende Kunststoff-Petrischalen (Durchmesser 9 mm) pipettiert. Auf diese Weise war eine gleichmäßige Schichtdicke bei allen Platten zu erzielen. Nach dem Erstarren des Nährbo-

dens wurden die Platten verwendet bzw. bis zum Gebrauch im Kühlschrank maximal eine Woche aufbewahrt.

Die zu untersuchenden Milchproben wurden stets gut durchmischt, bevor ein Papierblättchen mit einem Durchmesser von 13 mm (Fa. Schleicher und Schüll, Einbeck, Nr. 2668) mittels einer gesäuberten und mit Alkohol abgeflamten Pinzette eingetaucht wurde. Das Papierblättchen wurde dann nach Abstreifen der überschüssigen Milch am Rande des Probengefäßes auf die Oberfläche des Plate Count Agar-Testkultur-Gemisches vorsichtig aufgelegt und ganz leicht angedrückt. Jeweils 8 Proben (inklusive Kontrolle) konnten auf diese Weise pro Schale getestet werden.

Als Kontrolle diente eine Penicillin-Milch-Kontrolllösung, die 0,005 IE Penicillin G Natrium/ml enthielt. Diese Kontrolllösung wurde durch Auflösung des Penicillins in Aqua dest. und Vermischung mit hemmstofffreier Milch hergestellt. Ein mit dieser Kontrolllösung getränktes Papierblättchen wurde nach der letzten zu untersuchenden Milchprobe auf jede Platte gelegt.

Nachdem die Nährböden mit den Papierblättchen beschickt worden waren, wurden sie im Brutschrank 3 - 4 Stunden bei 67° C unter gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bebrütet. Das Auftreten durchgehender, wachstumsfreier klarer Zonen um die Blättchen (= Hemmhöfe) mit einem Radius von mindestens 1 mm wurde als Hinweis für das Vorhandensein von Substanzen gewertet, die das Wachstum von *B. stearothermophilus* hemmen. Die hemmstoffpositiven Milchproben wurden am gleichen Tage noch zwei weiteren Untersuchungen unterzogen. Einerseits wurden sie mit Hilfe von Penicillinase (Neutrapen, penicillinaseriker) auf die Anwesenheit von Penicillin getestet. Von einer Penicillinaselösung mit 1000 IE/ml, die mit sterilem Aqua dest. hergestellt wurde, wurden 0,4 ml zu

10 ml der positiven Probe gegeben. Der weitere Untersuchungsgang entsprach der bereits beschriebenen Methodik mit dem Unterschied, daß die mit den getränkten Papierblättchen beschickten Platten vor der Bebrütung zwecks besserer Vordiffusion erst eine halbe Stunde in den Kühlschrank verbracht wurden. War der Hemmhof einer Probe nach dem Penicillinasezusatz verschwunden oder kleiner geworden, wurde daraus geschlossen, daß die Probe entweder Penicillinrückstände allein oder in Verbindung mit anderen Therapeutika enthielt.

Andererseits wurde die Milch der positiven Proben für 5 Minuten bei 80° C im Wasserbad erhitzt und nach dem oben beschriebenen Verfahren auf die Anwesenheit hitzestabiler Hemmstoffe untersucht.

3.2.3. Agardiffusionstest mit Diagnostic Sensitivity Test Agar (DST) als Nährmedium

Dieser Test wurde in der gleichen Weise wie jener mit Plate Count Agar (PC) durchgeführt (s. 3.2.2.), nur wurde nicht PC, sondern der Diagnostic Sensitivity Test Agar (OXOID, CM 261) als Nährmedium eingesetzt. Auf eine Überprüfung der hemmstoffpositiven Proben hinsichtlich ihres Verhaltens nach Zugabe von Penicillinase bzw. Erhitzung von 5 Min. bei 80° C wurde verzichtet.

3.3. Befragung der Milch- lieferanten

Bei den positiven Proben (positiv im BRT und im Diffusionstest mit PC bzw. DST als Medium, Hemmhöfe mit einem Radius über 5 mm), wurde anhand der Kannennummern und der Tanknummern der Name des Lieferanten ermittelt. Die Lieferanten wurden an einem der darauffolgenden Tage aufgesucht und davon unterrichtet, daß in der von ihnen der Molkerei abgegebenen Milch Hemmstoffe nachgewiesen wurden. Sie wurden unter der Zusicherung, daß sich für sie keine nachteiligen Folgen aus der Beantwortung der ihnen gestellten Fragen ergeben würden, um Auskunft gebeten, ob am Tage der Ablieferung hemmstoffhaltiger Milch oder kurz zuvor eine antibiotische Behandlung in ihrem Milchviehbestand stattgefunden hatte und welcher Art diese gewesen sei. Außerdem wurde erfragt, durch wen die Behandlung erfolgt war und ob die gesetzlichen Bestimmungen der Ersten Verordnung zur Ausführung des Milchgesetzes bekannt seien.

3.4. E r g e b n i s s e

3.4.1. Häufigkeit hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilchproben in fünf Molkereien des Kreises Tecklenburg

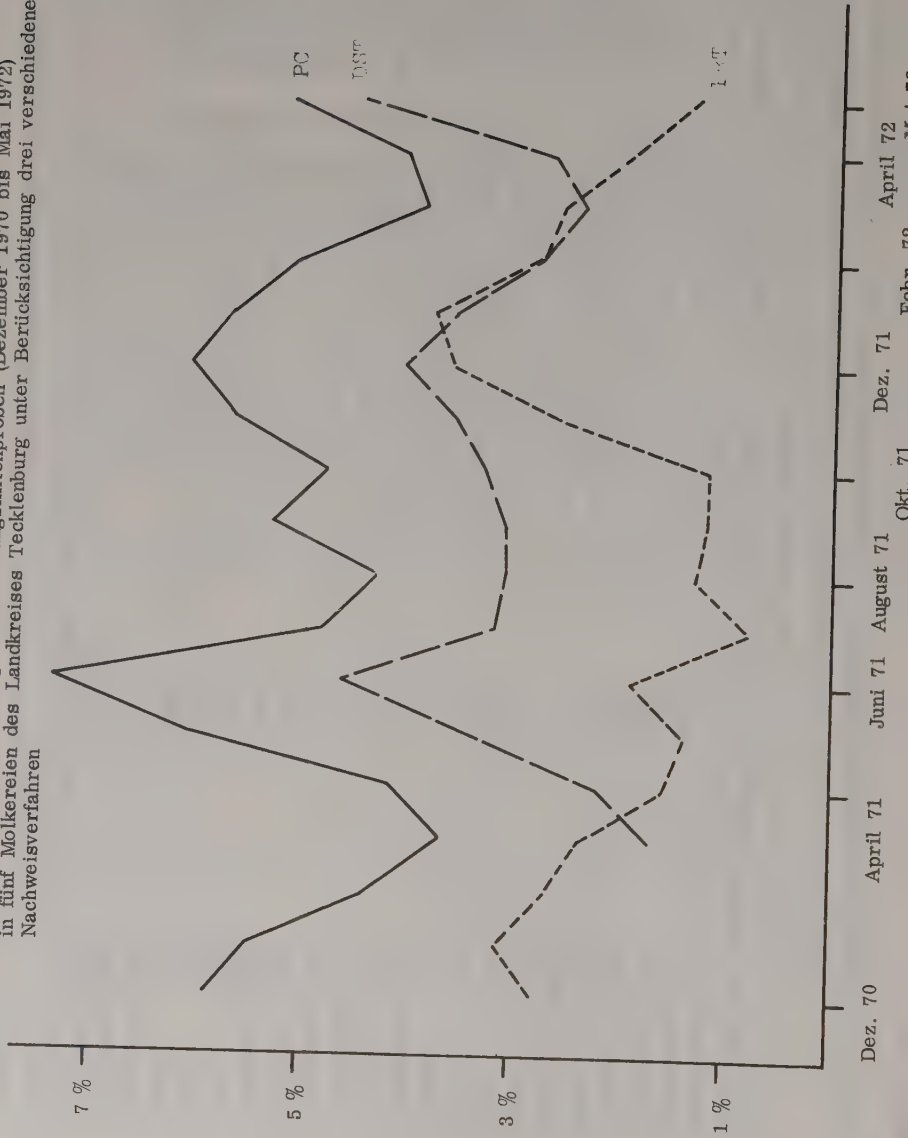
Die Untersuchung der 17.121 in der Zeit von Dezember 1970 bis einschließlich Mai 1972 sowie im August/September 1972 und Januar 1973 im Kreis Tecklenburg entnommenen und auf Hemmstoffe untersuchten Anlieferungsproben verlief bei 363 (2,1 %) positiv im Brillantschwarz-Reduktionstest (Tab. 4). Der Prozentsatz positiver Proben nahm ab dem ersten Untersuchungsmonat Dezember 1970 (2,8 %) nach einem kurzen Anstieg auf 3,2 % im Januar 1971 fast gleichmäßig (außer im Juni) bis zum Juli 1971 (0,8 %) ab. Dies war der niedrigste Wert im gesamten Versuch. Bis zum Januar 1972 stiegen die Werte wieder auf 3,8 %, dem höchsten Wert insgesamt, an. Ein regelmäßiger Abfall der Werte wurde bis zum Mai (1,4 %) festgestellt. Im August/September 1972 wurden mit 1,5 % bzw. 1,8 % etwa ähnliche Anteile positiver Proben registriert. Im Januar 1973 reagierten 3,5 % der Proben positiv. Im Vergleich der beiden Untersuchungsjahre 1971/72 fiel ein leichter Anstieg der positiven Proben im Jahre 1972 auf (Tab. 4, Abb. 2).

Im Agardiffusionstest mit Plate Count Agar als Medium (PC), der dem BRT parallel eingesetzt wurde, ergaben sich bei 868 (5,1 %) der in diesem Zeitraum getesteten Proben Hinweise auf das Vorliegen von Substanzen, die das Wachstum von *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* hemmen (Tab. 4). 534 (61,5 %) dieser hemmstoffhaltigen Proben wiesen Hemmhöfe mit einem Radius von mehr als einem mm und weniger als 5 mm auf, 237 (27,3 %) solche

Tabelle 4: Häufigkeit hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilchproben in fünf Molkereien des Landkreises Tecklenburg unter Berücksichtigung drei verschiedener Nachweisverfahren

Untersuchungsmonat	Anzahl der unter- suchten Proben	BRT-positiv	PC-positiv	DST-positiv
Dezember 1970	1370	38 (2,8 %)	81 (5,9 %)	-
Januar 1971	1255	40 (3,2 %)	71 (5,5 %)	-
Februar 1971	1355	37 (2,7 %)	59 (4,4 %)	-
März 1971	1943	47 (2,4 %)	72 (3,7 %)	34 (1,7 %)
April 1971	1470	24 (1,6 %)	61 (4,2 %)	33 (2,2 %)
Mai 1971	1177	17 (1,4 %)	72 (6,1 %)	42 (3,5 %)
Juni 1971	1362	26 (1,9 %)	102 (7,4 %)	64 (4,7 %)
Juli 1971	976	8 (0,8 %)	47 (4,8 %)	32 (3,3 %)
August 1971	875	12 (1,3 %)	46 (4,3 %)	35 (3,2 %)
September 1971	975	12 (1,2 %)	52 (5,3 %)	31 (3,2 %)
Oktober 1971	1197	15 (1,2 %)	48 (4,8 %)	34 (3,4 %)
November 1971	192	5 (2,6 %)	11 (5,7 %)	10 (3,6 %)
Dezember 1971	194	7 (3,6 %)	12 (6,1 %)	8 (4,1 %)
Januar 1972	576	22 (3,8 %)	33 (5,7 %)	21 (3,6 %)
Februar 1972	384	11 (2,8 %)	20 (5,2 %)	11 (2,8 %)
März 1972	576	17 (2,9 %)	23 (3,9 %)	14 (2,4 %)
April 1972	292	6 (2,0 %)	12 (4,1 %)	8 (2,7 %)
Mai 1972	285	4 (1,4 %)	15 (5,2 %)	13 (4,5 %)
August 1972	198	3 (1,5 %)	6 (3,0 %)	7 (3,5 %)
September 1972	272	5 (1,8 %)	12 (4,3 %)	10 (3,6 %)
Januar 1973	197	7 (3,5 %)	13 (6,5 %)	9 (4,6 %)
insgesamt	17 121	363 (2,1 %)	868 (5,1 %)	416 (3,2 %)

Abbildung 2: Häufigkeit hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilchproben (Dezember 1970 bis Mai 1972) in fünf Molkeereien des Landkreises Tecklenburg unter Berücksichtigung drei verschiedener Nachweisverfahren



von 5 - 10 mm und 97 (11,2 %) Hemmzonen über 10 mm (bei zwei Proben wurden sogar Hemmhöfe von über 20 mm abgelesen). Im Winter 1970/71 wurde der höchste Prozentsatz positiver Proben mit 5,9 % im ersten Untersuchungsmonat, Dezember 1970, ermittelt. Nach einem Rückgang der Anzahl der als positiv beurteilten Proben bis zum niedrigsten im Verlauf des Untersuchungsjahres 1971 registrierten Wert von 3,7 % im März erfolgte ein steiler Anstieg der positiven Proben bis zum Juni 1971 mit 7,4 %, dem höchsten Ergebnis im Sommer und im Agardiffusionstest mit PC als Medium überhaupt. Der Anteil positiver Proben fiel dann zum August auf 4,3 % ab, stieg im September auf 5,3 % und verringerte sich wieder leicht im Oktober auf 4,8 %. Es schloß sich ein Anstieg mit einem Maximum von 6,1 % der untersuchten Proben im Dezember 1971 an, danach eine stetige Abnahme bis auf 3,9 % im März 1972. Nach einem weiteren Gipfel im Mai 1972 (5,2 %) war mit 3,0 % im August das niedrigste Ergebnis während der gesamten Untersuchungszeit zu registrieren. Im Januar 1973 wurden 6,5 % der untersuchten Proben als positiv gewertet. Beim Vergleich von 1971 und 1972 ist eine leichte Verschiebung der positiven Proben festzustellen, da 1971 im Frühjahr etwas weniger Proben positiv waren als 1972, im Frühsommer und Sommer dagegen mehr (Tab. 4, Abb. 2).

Im Agardiffusionstest mit Diagnostic Sensitivity Test Agar (DST) als Medium, der erst ab 2.3.1971 mitlief, fielen 416 (3,2 %) der seit diesem Termin untersuchten 13 141 Proben als hemmstoffhaltig auf (Tab. 4). Die entsprechenden Werte für diese 13 141 Proben lauten im BRT 248 (1,8 %) und im Agardiffusionstest mit PC als Medium 657 (5,0 %). 255 (61,2 %) von den im Agardiffusionstest mit DST positiven Proben riefen Hemmhöfe mit einem Radius von mehr als 1 mm und weniger als 5 mm hervor,

127 (30,5 %) solche von 5-10 mm und nur 34 (8,3 %) Hemmzonen von über 10 mm. Hinsichtlich der monatlichen Häufigkeit positiver Proben ergab sich für die Monate März 1971 (1,7 %) bis Juni 1971 (4,7 %) eine ähnlich ansteigende Tendenz wie beim entsprechenden Test mit PC, wenn auch die Werte deutlich niedriger lagen. In den restlichen Untersuchungsmonaten des Jahres 1971 wurden nach einem Abfall auf 3,3 % im Juli bis einschließlich November nur unbedeutende Schwankungen in der Häufigkeit positiver Proben beobachtet. Im Dezember 1971 stieg der Wert der positiven Proben wieder auf 4,1 % an, um bis auf 2,4 % im März 1972 und 2,7 % im April abzufallen. Im Mai 1972 wurde mit 4,5 % ein relativ hoher Wert registriert, ebenso im Januar 1973 mit 4,6 % positiver Proben. Im Gegensatz zum Nachweis mit PC war 1972 ein leichter Anstieg der positiv reagierenden Proben im Vergleich zu den entsprechenden Monaten des Vorjahres festzustellen (Tab. 4, Abb. 2).

3.4.2. Einfluß einer Erhitzung der hemmstoffpositiven Rohmilchproben auf ihren Gehalt an nachweisbaren Rückständen

Die in der Zeit von Dezember 1970 bis Mai 1972 sowie August/September 1972 und Januar 1973 im BRT positiv beurteilten 363 Rohmilchproben wurden nach fünfminütigem Erhitzen auf 80° C noch einmal auf die Anwesenheit

Tabelle 5: Anzahl von Proben mit hitzestabilen (5 Min, 80° C) Hemmstoffen unter den hemmstoffhaltigen Anlieferungsmilchproben

Untersuchungsmonat	Anzahl der Proben			
	BRT-positiv		PC-positiv	
	roh	erhitzt	roh	erhitzt
Dezember 1970	38	29 (76,3 %)	81	46 (56,8 %)
Januar 1971	40	33 (82,5 %)	71	44 (62,0 %)
Februar 1971	37	30 (81,0 %)	59	41 (69,4 %)
März 1971	47	35 (74,5 %)	72	48 (66,7 %)
April 1971	24	18 (75,0 %)	-	-
Mai 1971	17	11 (64,7 %)	-	-
Juni 1971	26	21 (80,7 %)	-	-
Juli 1971	8	5 (62,5 %)	-	-
August 1971	12	6 (50,0 %)	46	29 (63,0 %)
September 1971	12	8 (66,7 %)	52	35 (55,7 %)
Oktober 1971	15	11 (73,3 %)	48	32 (66,7 %)
November 1971	5	3 (60,0 %)	11	7 (63,6 %)
Dezember 1971	7	5 (71,4 %)	12	7 (58,3 %)
Januar 1972	22	17 (77,2 %)	33	21 (63,6 %)
Februar 1972	11	8 (72,7 %)	20	14 (70,0 %)
März 1972	17	12 (70,6 %)	23	12 (51,9 %)
April 1972	6	5 (83,3 %)	12	8 (66,7 %)
Mai 1972	4	3 (75,0 %)	15	9 (60,0 %)
August 1972	3	2 (66,7 %)	6	4 (66,7 %)
September 1972	5	2 (40,0 %)	12	5 (41,6 %)
Januar 1973	7	5 (71,4 %)	13	7 (53,8 %)
insgesamt	363	269 (74,3 %)	586	369 (62,9 %)

von Hemmstoffen geprüft. 269 (74,3 %) dieser Proben enthielten hitzestabile Hemmstoffe (Tab. 5). Mindestens 80 % der Proben waren in den Monaten Januar, Februar und Juni 1971 sowie März und April 1972 auch nach der Erhitzung positiv, während in den Monaten Mai, Juli, August und November 1971 sowie September 1972 weniger als 2/3 der Proben auch nach der Erhitzung noch positiv zu beurteilen waren. Am niedrigsten war der Anteil der vor und nach der Erhitzung gleichartig reagierenden Proben im September 1972 mit 40,0 %, am höchsten im April 1972 mit 83,3 % (Tab. 5).

Von den 586 in den Monaten Dezember 1970 bis einschließlich März 1971, August 1971 bis Mai 1972, August/September 1972 sowie Januar 1973 im Agardiffusionstest mit PC als Medium positiven Proben wiesen 369 (62,9 %) hitzestabile Hemmstoffrückstände auf (Tab. 5). Die 282 in den Monaten April bis Juli 1971 positiv beurteilten Rohmilchproben konnten aus arbeitstechnischen Gründen einer Erhitzung nicht unterzogen werden. In den Monaten Februar, März, Oktober 1971 und Februar, April, August 1972 reagierten mindestens 2/3 der getesteten Proben sowohl vor als auch nach der Erhitzung positiv, am meisten im Februar 1972 mit 70 %. Am größten war die Differenz in dem Anteil positiver Proben im September 1972, als nur 41,6 % der getesteten und positiven Rohmilchproben auch hitzestabile Hemmstoffe (5 Min bei 80° C) in nachweisbaren Mengen enthielten (Tab. 5).

Von weiterer Bedeutung für die Bestimmung des Erhitzungseinflusses war auch die Größe der Hemmhöfe (Tab. 6). Von 354 Anlieferungsmilchproben mit einem

Tabelle 6: Einfluß der Erhitzung (5 Min, 80° C) hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilchproben auf die Hemmhofofgröße im Agardiffusionstest mit PC als Medium

Untersuchungsmonat	Anzahl der Milchproben mit einer Hemmhofofgröße (Radius in mm)									
	<5 roh	<5 erhitzt	0	5-10 roh	5-10 erhitzt	0	>10 roh	>10 erhitzt	0	
Dezember 1970	40	11	29	31	17	4	10	5	3	0
Januar 1971	31	7	24	18	12	2	4	19	2	0
Februar 1971	17	7	10	26	14	4	8	13	3	0
März 1971	39	14	25	17	12	3	2	9	6	0
August 1971	38	18	20	6	1	1	4	0	0	0
September 1971	45	27	18	7	3	4	0	0	0	0
Oktober 1971	40	25	15	6	2	4	0	0	0	0
November 1971	8	3	5	3	1	2	0	0	0	0
Dezember 1971	7	5	2	2	1	1	0	1	0	0
Januar 1972	25	8	17	5	2	3	0	3	0	0
Februar 1972	14	5	9	4	1	2	1	2	0	0
März 1972	10	4	6	8	3	3	2	0	0	0
April 1972	7	2	5	5	2	1	2	1	2	0
Mai 1972	11	5	6	3	1	1	1	0	0	0
August 1972	4	3	1	2	2	0	0	0	0	0
September 1972	8	3	5	3	1	2	0	0	0	0
Januar 1973	10	2	8	3	2	1	0	0	0	0
insgesamt	354	149	205	149	77	38	34	50	16	0
										17

Hemmhof von weniger als 5 mm im Agardiffusionstest mit PC waren bei 205 (57,8 %) nach der Erhitzung keine Hemmzonen feststellbar, während bei den restlichen 149 Proben die Hemmhöfe weitgehend unverändert blieben. Von den 149 Rohmilchproben mit einem Hemmhof von 5-10 mm blieben nach der Erhitzung 77 (51,6 %) unverändert, bei 38 (25,6 %) war der Radius kleiner als 5 mm und bei 34 (22,8 %) war keinerlei Hemmung mehr festzustellen. Von den 83 Rohmilchproben mit einem Hemmhof über 10 mm wurden 17 (20,5 %) vollständig inaktiviert, bei 16 (19,2 %) war der Hemmhof nach der Erhitzung zwischen 5 und 10 mm groß und bei 50 (60,2 %) zeigte sich keinerlei Einfluß infolge der vorgenommenen Erhitzung.

3.4.3. Einfluß des Zusatzes von Penicillinase zu hemmstoffpositiven Rohmilchproben auf ihren Gehalt an nachweisbaren Rückständen

Zur Ermittlung des Anteils von Proben, die Rückstände nicht-synthetischer Penicilline enthielten, wurde den positiven Proben Penicillinase zugesetzt. Tabelle 7 zeigt, daß von den 868 im Agardiffusionstest mit PC als Medium positiven Anlieferungsmilchproben nach Penicillinasezusatz und nochmaliger Durchführung des Blättchentestes 438 Proben (50,7 %) einen deutlich kleineren Hemmhof aufwiesen und bei weiteren 199 (22,9 %) der Hemmhof vollständig verschwand. Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei den Hemmstoffrückständen in 637 (73,6 %) Proben zu einem unterschiedlichen Anteil um Penicillin handelte. Bei 231 Proben (26,4 %) war die Hemmhofgröße ohne und mit Zusatz von Penicillinase

Tabelle 7: Häufigkeit der hemmstoffhaltigen Anlieferungsmilchproben (PC) mit durch Penicillinase inaktivierbaren Rückständen

Untersuchungsmonat	Anzahl der hemmstoffhaltigen Proben	Anzahl der Proben mit inaktivierbaren Rückständen		insgesamt
		teilweise	vollständig	
Dezember 1970	81	31 (38,3 %)	19 (23,4 %)	50 (61,7 %)
Januar 1971	71	30 (42,3 %)	23 (32,4 %)	53 (74,7 %)
Februar 1971	59	28 (47,5 %)	18 (30,5 %)	46 (78,0 %)
März 1971	72	33 (45,8 %)	19 (26,4 %)	52 (72,2 %)
April 1971	61	33 (54,1 %)	15 (24,6 %)	48 (78,7 %)
Mai 1971	72	43 (59,7 %)	9 (12,5 %)	52 (72,2 %)
Juni 1971	102	61 (59,8 %)	13 (12,8 %)	74 (72,6 %)
Juli 1971	47	31 (66,0 %)	7 (14,9 %)	38 (80,9 %)
August 1971	46	22 (47,8 %)	15 (32,6 %)	37 (80,4 %)
September 1971	52	30 (57,7 %)	12 (23,1 %)	42 (80,8 %)
Oktober 1971	48	24 (50,0 %)	11 (22,9 %)	35 (72,9 %)
November 1971	11	5 (45,3 %)	3 (27,2 %)	8 (72,5 %)
Dezember 1971	12	5 (41,6 %)	2 (16,6 %)	7 (58,2 %)
Januar 1972	33	15 (45,4 %)	7 (21,2 %)	22 (66,6 %)
Februar 1972	20	9 (45,0 %)	5 (25,0 %)	14 (70,0 %)
März 1972	23	10 (43,3 %)	6 (26,3 %)	16 (69,6 %)
April 1972	12	7 (50,8 %)	3 (23,3 %)	10 (74,1 %)
Mai 1972	15	7 (40,6 %)	5 (33,3 %)	12 (73,9 %)
August 1972	6	2 (33,3 %)	2 (33,3 %)	4 (66,6 %)
September 1972	12	5 (40,4 %)	3 (25,0 %)	8 (65,4 %)
Januar 1973	13	7 (53,8 %)	2 (15,3 %)	9 (69,1 %)
insgesamt	868	438 (50,5 %)	199 (22,9 %)	637 (73,4 %)

gleich groß, so daß die Hemmung des Wachstums von *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* auf andere Wirkstoffrückstände zurückzuführen ist. Der Anteil der hemmstoffhaltigen Proben mit nicht, auch nicht teilweise, durch Penicillinase inaktivierbaren Rückständen war im Dezember 1970 mit 38,3 % und im Dezember 1971 mit 41,8 % besonders hoch, besonders niedrig in den Monaten Juli, August und September mit weniger als 20 % (Tab. 7).

3.4.4. Einfluß der Probenherkunft (Molkereieinzugsbereich) auf den Anteil hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilch

In den Tabellen 8 - 12 wurden die untersuchten Proben entsprechend den Einzugsbereichen der verschiedenen Molkereien aufgeteilt, um auf diese Weise eventuelle herkunftsbedingte Unterschiede nachweisen zu können. Danach wurden Hemmstoffe im Einzugsbereich der Molkerei Recke (Tab. 10) im Durchschnitt am seltensten gefunden (BRT: 1,4 %; PC: 4,0 %; DST: 2,4 %), am häufigsten dagegen (BRT: 3,0 %; PC: 6,6 %; DST: 4,3 %) im Einzugsbereich der Molkerei Kattenvenne (Tab. 12). Für die anderen drei Molkereien des Kreises Tecklenburg lauteten die entsprechenden Werte:

Westerkappeln: BRT: 2,0 %, PC: 4,5 %, DST: 2,7 % (Tab.8)
Ibbenbüren: BRT: 1,9 %, PC: 4,5 %, DST: 2,9 % (Tab.9)
Lengerich: BRT: 2,3 %, PC: 5,8 %, DST: 3,4 % (Tab.11).

Für alle Proben ohne Berücksichtigung ihrer Herkunft waren folgende Durchschnittswerte für den Anteil hemmstoffhaltiger Proben registriert worden (Tab. 4):

Tabelle 8: Häufigkeit hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilchproben im Einzugsbereich der Molkerei Westerkappeln

Untersuchungsmonat	insgesamt	Anzahl der Proben		
		BRT-positiv	PC-positiv	DST-positiv
Dezember 1970	255	8 (3,1 %)	15 (5,9 %)	-
Februar 1971	480	13 (2,7 %)	18 (3,8 %)	-
März 1971	384	9 (2,3 %)	12 (3,1 %)	7 (1,8 %)
April 1971	195	0	5 (2,6 %)	0
Mai 1971	491	11 (2,2 %)	29 (5,9 %)	18 (3,7 %)
Juni 1971	288	2 (0,7 %)	18 (6,3 %)	7 (2,4 %)
August 1971	390	0	10 (2,6 %)	6 (1,5 %)
September 1971	390	4 (1,0 %)	18 (4,6 %)	11 (2,8 %)
Januar 1972	192	9 (4,6 %)	14 (7,3 %)	9 (4,6 %)
Februar 1972	192	6 (3,1 %)	12 (6,2 %)	5 (2,5 %)
September 1972	96	3 (3,1 %)	4 (4,1 %)	4 (4,1 %)
Januar 1973	197	7 (3,5 %)	13 (6,6 %)	9 (4,5 %)
insgesamt	3550	72 (2,0 %)	168 (4,5 %)	76 (2,7 %)

Tabelle 9: Häufigkeit hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilchproben im Einzugsbereich
der Molkerei Ibbenbüren

Untersuchungsmonat	insgesamt	Anzahl der Proben		
		BRT-positiv	PC-positiv	DST-positiv
Dezember 1970	284	6 (2,1 %)	9 (3,2 %)	-
Januar 1971	387	15 (3,9 %)	28 (7,2 %)	-
Februar 1971	192	0	0	-
März 1971	984	23 (2,3 %)	29 (2,9 %)	13 (1,3 %)
April 1971	192	2 (1,0 %)	7 (3,6 %)	8 (4,2 %)
Mai 1971	195	0	5 (2,6 %)	3 (1,5 %)
Juni 1971	391	14 (3,6 %)	44 (11,3 %)	34 (8,6 %)
Juli 1971	489	4 (0,8 %)	18 (3,7 %)	15 (3,1 %)
August 1971	95	2 (2,1 %)	12 (10,2 %)	7 (6,9 %)
September 1971	195	0	4 (2,1 %)	1 (0,5 %)
Oktober 1971	705	10 (1,4 %)	32 (4,5 %)	27 (3,8 %)
Januar 1972	192	6 (3,1 %)	9 (4,6 %)	4 (2,0 %)
März 1972	192	4 (2,0 %)	7 (3,6 %)	0
Mai 1972	189	3 (1,4 %)	9 (4,7 %)	8 (4,2 %)
insgesamt	4682	89 (1,9 %)	213 (4,5 %)	120 (2,9 %)

Tabelle 10: Häufigkeit hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilchproben im Einzugsbereich der Molkerei Recke

Untersuchungsmonat	insgesamt	Anzahl der Proben		
		BRT-positiv	PC-positiv	DST-positiv
Dezember 1970	284	0	12 (4,2 %)	-
Januar 1971	292	8 (2,7 %)	14 (4,8 %)	-
Februar 1971	195	3 (1,5 %)	7 (3,6 %)	-
März 1971	192	0	3 (1,6 %)	0
April 1971	296	0	9 (3,0 %)	0
Mai 1971	296	0	11 (3,7 %)	2 (0,7 %)
Juni 1971	195	6 (3,1 %)	9 (4,6 %)	11 (5,1 %)
Juli 1971	291	0	8 (2,7 %)	5 (1,7 %)
Oktober 1971	105	0	4 (3,8 %)	0
Dezember 1971	194	7 (3,5 %)	12 (6,1 %)	8 (4,1 %)
Januar 1972	192	7 (3,6 %)	10 (5,2 %)	8 (4,1 %)
März 1972	192	6 (3,1 %)	9 (4,6 %)	8 (4,1 %)
April 1972	100	4 (4,0 %)	8 (8,0 %)	5 (5,0 %)
August 1972	198	3 (1,5 %)	6 (3,0 %)	7 (3,5 %)
September 1972	176	2 (1,1 %)	8 (4,8 %)	6 (3,4 %)
insgesamt	3198	46 (1,4 %)	130 (4,0 %)	60 (2,4 %)

Tabelle 11: Häufigkeit hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilchproben im Einzugsbereich der Molkerei Lengerich

Untersuchungsmonat	insgesamt	Anzahl der Proben		
		BRT-positiv	PC-positiv	DST-positiv
Dezember 1970	155	7 (4,5 %)	17 (11,0 %)	-
Januar 1971	576	17 (3,0 %)	29 (5,0 %)	-
April 1971	296	6 (2,0 %)	13 (4,4 %)	6 (2,0 %)
Juni 1971	385	3 (0,8 %)	16 (4,2 %)	5 (1,3 %)
Juli 1971	196	4 (2,0 %)	21 (10,7 %)	12 (6,1 %)
August 1971	195	7 (3,6 %)	14 (7,2 %)	15 (7,6 %)
September 1971	195	3 (1,5 %)	18 (9,2 %)	9 (4,6 %)
Oktober 1971	195	5 (2,6 %)	12 (6,2 %)	7 (3,6 %)
März 1972	192	7 (3,6 %)	7 (3,6 %)	6 (3,1 %)
April 1972	192	2 (1,0 %)	4 (2,0 %)	3 (1,5 %)
insgesamt	2577	61 (2,3 %)	151 (5,8 %)	63 (3,4 %)

Tabelle 12: Häufigkeit hemmstoffhaltiger Anlieferungsmilchproben im Einzugsbereich
der Molkerei Kattenvenne

Untersuchungsmonat	insgesamt	Anzahl der Proben		
		BRT-positiv	PC-positiv	DST-positiv
Dezember 1970	392	17 (4,3 %)	28 (7,1 %)	-
Februar 1971	488	21 (4,3 %)	34 (7,0 %)	-
März 1971	383	15 (3,9 %)	28 (7,3 %)	14 (3,7 %)
April 1971	491	16 (3,3 %)	27 (5,5 %)	19 (3,9 %)
Mai 1971	195	6 (3,1 %)	27 (13,9 %)	19 (9,7 %)
Juni 1971	103	1 (1,5 %)	15 (14,6 %)	7 (6,8 %)
August 1971	195	3 (1,5 %)	10 (5,1 %)	7 (3,6 %)
September 1971	195	5 (2,6 %)	12 (6,2 %)	10 (5,1 %)
Oktober 1971	192	0	0	0
November 1971	192	5 (2,5 %)	11 (5,7 %)	10 (3,6 %)
Februar 1972	192	5 (2,5 %)	8 (4,1 %)	6 (3,1 %)
Mai 1972	96	1 (1,0 %)	6 (6,2 %)	5 (5,2 %)
insgesamt	3114	95 (3,0 %)	206 (6,6 %)	97 (4,3 %)

2,1% (BRT) , 5,1% (PC) , 3,2% (DST) . Über 7% der untersuchten Proben (PC) waren positiv in Westerkappeln (Tab.8) im Januar 1972 , in Ibbenbüren (Tab.9) im Januar , Juni (11,3%!) und August 1971 , in Recke (Tab.10) im April 1972 , in Lengerich (Tab.11) im Dezember 1970 , Juli , August und September 1971 und in Kattenvenne (Tab.12) im Dezember 1970 , März ; Mai (13,9%!) und Juni 1971 (14,6%) .

In Westerkappeln fielen während der Testzeit 118 Milchviehhalter auf, davon 6 zwei Mal und 4 drei Mal, in Kattenvenne waren es 133. Davon wurden 10 Besitzer zwei Mal, 6 Besitzer drei Mal, 3 Besitzer vier Mal und ein Besitzer sogar fünf Mal ermittelt. In Recke dagegen wurden nur bei einem von 55 ermittelten Lieferanten wiederholt (3 Mal) Hemmstoffe registriert. In Ibbenbüren fielen von 138 Milchviehhaltern 9 zwei, 4 drei und einer vier Mal auf. In Lengerich wurden schließlich von 113 Lieferanten 6 zwei Mal und 1 drei Mal ermittelt. Die zu den Tabellen 8 - 12 bestehenden Differenzen (Anzahl hemmstoffpositiver Proben im Vergleich zu der Anzahl der Lieferanten) ergibt sich daraus, daß bei der Untersuchung von Kannenmilchproben z.T. pro Lieferant mehrere positive Resultate zu registrieren waren.

3.4.5. Auskünfte der Milchlieferanten

Von den Anlieferungsmilchproben, die im BRT positiv waren und im Agardiffusionstest mit PC bzw. DST als Medium Hemmhöfe über 5 mm aufwiesen, wurden die Lieferanten ermittelt. Diese wurden u.a. auch befragt, ob vor weniger als 5 Tagen vor Abgabe der Milch eine antibiotische Behandlung der Milchtiere erfolgt war. Von den 407 Milchlieferanten, die um Auskunft gebeten wurden, gaben 298 (73,2 %) an, daß eine Behandlung in dem erwähnten Zeitraum stattgefunden hätte. In 17 Betrieben (5,7 %) war eine parenterale (i.m.) und in 281 (94,3 %) eine intrazisternale Behandlung vorgenommen worden. Die intrazisternale Behandlung erfolgte in 254 Beständen durch den Besitzer, in 27 durch den Tierarzt. 109 (26,8 %) Milchlieferanten behaupteten, von einer durchgeführten Behandlung nichts zu wissen. Über die gesetzlichen Vorschriften des Ablieferungsverbots schien kein Milcherzeuger vollständig informiert zu sein.

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Nach § 3 Nr. 1 g der Ersten Verordnung zur Ausführung des Milchgesetzes ist es verboten, Milch von Kühen, die mit in die Milch übergehenden Arzneimitteln behandelt werden oder vor weniger als 5 Tagen behandelt worden sind, für andere zu gewinnen oder in den Verkehr zu bringen. Aus diesem Grunde werden seit einiger Zeit in Schleswig-Holstein (GVOBL. für Schleswig-Holstein, 1971), Bayern (Bayer.GVOBL., 1972), Baden-Württemberg (GVOBL. für Baden-Württemberg, 1973) und Nordrhein-Westfalen (GV. NW, 1973) regelmäßige Kontrollen der Anlieferungsmilch auf antibiotisch wirksame Substanzen (einmal monatlich) durchgeführt. Auch in der Hygieneverordnung für Milch-ab-Hof-Abgabe (BGBL. 1973) wird gefordert, daß Hemmstoffe nicht nachweisbar sein dürfen. Untersuchungen haben jedoch gezeigt (Übersicht 1), daß immer wieder hemmstoffhaltige Milch an die Molkereien abgeliefert wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind ca. 2 Jahre lang mit einigen Unterbrechungen Anlieferungsmilchproben der Molkereien des Kreises Tecklenburg (Nordrhein-Westfalen) entnommen und mittels verschiedener Nachweisverfahren auf Rückstände von Hemmstoffen untersucht worden. Die Anlieferung betrug im Jahre 1971 mehr als 60 Millionen kg Milch. Im einzelnen wurden von Dezember 1970 bis Mai 1972, sowie August/September 1972 und Januar 1973 insgesamt 17 121 Proben mit dem BRT und parallel dazu mit dem Agardiffusionstest mit PC als Medium getestet. Ab März 1971 lief zusätzlich noch der Agardiffusionstest mit DST bei 13 141 Proben mit. Während im BRT 363 Proben (2,1 %) positiv bewertet wurden (Tab. 4), waren es im Agardiffusionstest mit PC 868 (5,1 %). Im Agardiffusionstest mit DST fielen 416 (3,2 %) der Proben auf - die Vergleichszahlen für BRT bzw. PC in dem entsprechenden Zeitraum lauteten: 248 (1,8 %) bzw.

657 (5,0 %). Die von anderen Autoren im deutschen Schrifttum genannten Werte liegen etwa im gleichen Bereich. Mit dem BRT wurden z.B. 0,45 % (SCHRAUDY und RAUSCHER, 1972), 0,52 % (NEUMANN et al., 1971 sowie NEUMANN, 1972), 0,57 % (LUPKE, 1972), 0,9 % (KLEIN, 1972), 1 % (BRUNN, 1971), 1,3 % (MATTHEIS, 1971), 1,6 % (KRAACK und TOLLE, 1967), 2,2 % (TOLLE et al., 1968), 2,4 % (KRAACK und TOLLE, 1969), 2,68 % (TOLLE, 1973), 3,6 % (TOLLE et al., 1968) bzw. 8 % (MÜLLER, 1969) der Proben als hemmstoffhaltig erkannt. Während bei Untersuchungen im Agardiffusionstest mit PC deutlich geringere Anteile als in den eigenen Untersuchungen beschrieben wurden (0,3 % BRUNN (1971); 0,9 % HENTSCHKE (1972); 1,1 % TERPLAN, ZAADHOF und MATTHEIS (1972)), liegen für DST keine Zahlen vor. Bei diesen Vergleichen bleibt jedoch zu berücksichtigen, daß die Proben der verschiedenen Untersuchungsreihen an unterschiedlichen Stellen entnommen wurden (Tank bzw. Waage gegenüber Kanne) und hierdurch auch gewisse Differenzen bedingt sein dürften. Außerdem spielt auch die Herkunft der Proben eine Rolle. Dies wird deutlich, wenn man die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen in fünf verschiedenen Molkereien (Tab. 8 - 12) betrachtet. Am häufigsten wurde hemmstoffhaltige Milch im Einzugsbereich der Molkerei Kattenvenne abgeliefert (BRT: 3 %, PC: 6,6 %, DST: 4,3 %), am seltensten in Recke (BRT: 1,4 %, PC: 4,0 %, DST: 2,4 %). Diese Unterschiede sind vermutlich z.T. darauf zurückzuführen, daß die südlichen Gebiete des Kreises Tecklenburg - insbesondere Kattenvenne, aber auch Lengerich (Abb. 1) - sehr feucht sind und die Weiden dort mangelhaft drainiert sind. Aus diesem Grunde sind, wie Umfragen bei den praktizierenden Tierärzten ergeben haben, in den Sommermonaten häufiger antibiotische Behandlungen notwendig als in anderen Gebieten des

Kreises. TOLLE et al. (1968) bzw. KRAACK und TOLLE (1969) sowie TOLLE (1973) hatten im übrigen ähnlich differierende Ergebnisse in verschiedenen Molkereieinzugsgebieten beobachten können und als Extremwerte 0 % und 5,3 % bzw. 0,1 % und 7,5 % positive Proben ermittelt. Auf die prozentualen Unterschiede, die mit den drei eingesetzten Verfahren bei der Erfassung hemmstoffpositiver Proben zu beobachten waren, wird noch ausführlich einzugehen sein.

Das Vorkommen von Hemmstoffen in der Milch scheint jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen zu sein, ohne daß sich jedoch immer ein einheitliches Bild zeigt. FRANK (1962) fand den höchsten Wert im September (7,5 %), den niedrigsten im April (0,6 %). MATTHEIS (1971) ermittelte einen deutlich höheren Prozentsatz im Mai und nach einer Abnahme während der Sommermonate wieder eine leichte Zunahme im Herbst. Allerdings war über die Verhältnisse in den Wintermonaten keine Aussage möglich, da von Januar bis einschließlich April nicht untersucht wurde. TOLLE et al. (1968) gaben an, daß von Juni bis September 2,1 % der Proben positiv reagierten, während es im Februar/März beim gleichen Ausgangsmaterial 3,6 % waren. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch LUPKE (1972) sowie LIMMER und WÖBBECKE (1972). Nach LUPKE begann der Anstieg in der Zahl hemmstoffhaltiger Proben im November (0,49 %), was mit dem Beginn der Stallhaltung ungefähr übereinstimmt. Der Anteil dieser Proben erreichte etwa im Januar den Höhepunkt (0,84 %), blieb bis etwa April auf diesem Niveau und nahm zum Weideaustrieb ab, um während der Weideperiode (einschließlich Oktober) bei einem Mittelwert von ca. 0,3 % zu bleiben. LIMMER und WÖBBECKE (1972) stellten fest, daß während der Stallhaltungsperiode (Oktober bis April) über 8 Mal mehr hemmstoffhaltige Milch an die Molkereien abgeliefert wurde als während des Weideganges. Bei den eigenen Unter-

suchungen, die nur für die zusammenhängende Zeit von Dezember 1970 bis einschließlich Mai 1972 berücksichtigt werden sollen, ergab sich folgendes Bild (Tab. 4, Abb. 2): Bei der Testung der Proben mit dem BRT wurde im Januar 1971 mit 3,2 % der erste Gipfel erreicht. Bis einschließlich Mai nahm die Anzahl der positiven Proben deutlich ab, um im Juni um 0,5 % auf 1,9 % anzusteigen. Nach einem Tiefstwert von 0,8 % im Juli und einem leichten Anstieg zum August mit nahezu gleichbleibendem Niveau bis einschließlich Oktober war eine deutliche Zunahme mit einem Höchstwert von 3,8 % im Januar 1972 gegeben. Anschließend nahm die Zahl der hemmstoffpositiven Proben wie im Vorjahr stetig ab. Im Agardiffusionstest mit PC, deutlicher noch mit DST als Medium, wurde ein etwas abweichendes Bild registriert. Zwar nahm beim PC-Medium die Anzahl der positiven Proben bis zum März ebenfalls ab, doch erfolgte dann ein Anstieg bis zum Juni auf 7,4 %. Nach einem deutlichen Rückgang war ab November wieder eine Zunahme zu beobachten. Im März und April wurden erneut weniger positive Proben gefunden, im Mai jedoch gleich viele wie im Februar. Beim Test mit DST-Medium stieg die Anzahl der positiven Proben von März bis Juni stetig an, um dann nach einem Abfall bis einschließlich Oktober auf etwa der gleichen Ebene zu bleiben. Einem Anstieg zum Winter mit Gipfel im Dezember folgte eine erneute Abnahme bis April. Im Mai fielen wieder erheblich mehr Proben auf. Zusammenfassend läßt sich dazu jedoch sagen, daß in den Sommermonaten - von Juni (bei PC und DST auch Mai) abgesehen - im Durchschnitt weniger hemmstoffhaltige Milch abgeliefert wurde als in den Wintermonaten, speziell Dezember und Januar. Somit finden die Ergebnisse der anderen Autoren eine weitgehende Bestätigung. Als Ursache für den höheren Anteil hemmstoffhaltiger Milch während der Wintermonate sind u.a. die mit den in dieser Jahreszeit häufigen

Abkalbungen (TOLLIE et al., 1968), die nicht selten mit Komplikationen verbunden sind, wie auch fieberhaften Allgemeinerkrankungen in Verbindung stehenden antibiotischen Behandlungen angeführt worden. Unter den fieberhaften Erkrankungen kommt nach MATTHEIS (1971) insbesondere auch den Mastitiden erhebliche Bedeutung zu. Die in den Sommermonaten Mai und Juni registrierten hohen Prozentsätze an hemmstoffhaltiger Milch dürften auf klimabedingte therapeutische Eingriffe zurückzuführen sein. In diesem Jahr konnte z.B. ebenfalls in diesen Monaten eine Häufung sogenannter Erkältungskrankheiten beobachtet werden, die parenteral mit Antibiotika behandelt wurden.

Um zu klären, ob es sich bei den Hemmstoffen in den Anlieferungsmilchproben um Penicillinrückstände handelte, wurden die im Agardiffusionstest mit PC als Medium ermittelten 868 positiven Proben mit Penicillinase versetzt und erneut untersucht (Tab. 7). Bei 199 (22,9 %) Proben wurde der Hemmstoff durch Penicillinase vollständig inaktiviert, bei 438 (50,7 %) Proben teilweise. Insgesamt konnten somit in 637 (73,6 %) Proben Penicillinrückstände nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich auch ungefähr mit den Antworten der praktizierenden Tierärzte des Kreises Tecklenburg hinsichtlich der von ihnen verwendeten Medikamente. Zum größten Teil kommt Penicillin alleine oder in Kombination mit anderen Substanzen wie z.B. Streptomycin oder Chloramphenicol zur Verwendung (ca. 70 %). Zu 28 % werden Tetracycline eingesetzt, die restlichen 2 % teilen sich auf Chloramphenicol, Erythromycin, Kanamycin und andere Antibiotika auf. Sulfonamide finden zur Mastitistherapie durchweg keine Anwendung. Auch von anderen Untersuchern wurden die Hemmstoffe in der Milch überwiegend als Penicillin identifiziert. Der Anteil dieses Antibiotikums an den hemmstoffhaltigen Proben wird dabei folgendermaßen ange-

geben: 61 % (TOLLE et al., 1968), 64,3 % (KRAACK und TOLLE, 1969), ca. 67 % (TERPLAN und ZAADHOF, 1969), 70 - 80 % (FORSCHNER, 1973 b), ca. 78 % (HENTSCHE, 1972), 79,6 % (NEUMANN, 1972), 80,1 % (NEUMANN et al., 1971), 81,6 % (LUPKE, 1972), 97 % (SCHRAUDY und RAUSCHER, 1972), 100 % (MATTHEIS, 1971) bzw. 23,5 % - 72 % (KOLLEGIUM DER BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG, 1969; TOLLE, 1973). MATTHEIS (1971) hatte bereits darauf hingewiesen, daß diese Unterschiede einerseits durch die häufig sehr differierenden Behandlungsmethoden, z.B. Einsatz verschiedener Antibiotika, bedingt sein können, andererseits aber auch die Art des Nachweisverfahrens das Ergebnis beeinflussen kann. Letzteres ist z.B. bei Kombinationspräparaten mit Penicillin im BRT in Erwägung zu ziehen, wenn der nicht-penicillin-haltige Anteil zur Hemmung der Testkeime ausreicht. Beim Diffusionstest mit PC bzw. DST ist dann zwar auch noch ein Hemmhof vorhanden, jedoch ist er kleiner als vor Zusatz der Penicillinase. Es bliebe im übrigen noch zu prüfen, inwieweit sich auch synthetische Penicilline nach Erhitzung der Milchproben (5 Min bei 85° C) und Zusatz von Penicillinase erfassen lassen. Aus der Arbeit BRUNN (1971) wird z.B. ersichtlich, daß in erhitzter, Stapenor-haltiger Milch höhere Konzentrationen durch Penicillinase inaktiviert werden, als in roher Milch.

Des weiteren wurde geprüft, wie viele der hemmstoffpositiven Proben hitzestabile Substanzen (5 Min bei 80° C) aufwiesen. Von den 363 im BRT positiven Rohmilchproben reagierten nach der Erhitzung 74,3 % wieder positiv, während von 586 in dem Agardiffusionstest mit PC aufgefallenen Proben nur 62,9 % hitzestabile Hemmstoffe enthielten. (Bei den restlichen 282 positiven Rohmilchproben konnte der Erhitzungsversuch aus arbeitstechnischen Gründen nicht durchgeführt werden.) Die vergleichsweise

erhebliche Abnahme positiver Proben im empfindlicheren Diffusionstest ist in erster Linie dadurch bedingt, daß 205 (57,8 %) von 354 Rohmilchproben mit einem Hemmhof von weniger als 5 mm Radius nach der Erhitzung negativ reagierten. Unter den 232 Rohmilchproben mit größeren Hemmhöfen wurde eine vollständige Inaktivierung der hemmenden Substanzen als Folge der Erhitzung nur bei 51 (22 %) festgestellt. KRAACK und TOLLE (1969) hatten beobachtet, daß im BRT 44 von 2103 Proben positiv reagierten, wenn unerhitzte Milch untersucht wurde, und nur 41 bei erhitzter Milch. Nach dem Erhitzungsprozeß waren somit 6,8 % der ursprünglich positiven Proben in einer anderen Reaktionsstufe zu finden. Die Inaktivierung der Hemmstoffe kann zum einen dadurch bedingt sein, daß es sich um hitzelabile milcheigene Substanzen handelte, welche die Hemmwirkung in der Rohmilch bewirkten, zum anderen dadurch, daß in geringer Menge in der Rohmilch vorhandene Antibiotika durch die Erhitzung so weit zerstört werden, daß sie mit dem Test nicht mehr zu erfassen waren. Eine Klärung dieser Frage wäre jedoch nur möglich gewesen, wenn z.B. mittels chemisch-physikalischer Methoden die Identität der hemmenden Prinzipien bestimmt worden wäre. Durch die Erhitzung der Milchproben (5 Min bei 80° C) ist keine eindeutige Differenzierung zwischen Chemotherapeutika, insbesondere Antibiotika, und unspezifischen Hemmstoffen möglich. Umfangreiche Versuche verschiedener Wissenschaftler haben nämlich gezeigt, daß zwar Chloramphenicol durch eine derartige Erhitzung nicht beeinflußt wird, bei den anderen in der Veterinärmedizin sehr gebräuchlichen Antibiotika Penicillin, Streptomycin und Tetracyclin jedoch ein gewisser Aktivitätsverlust zustandekommt (s. Übersicht 2), so daß falsch-negative Ergebnisse vorgetäuscht werden (WATROUS et al., 1962). Dies zeigte sich auch bei den von BRUNN (1971) mit verschiedenen

Methoden durchgeführten Vergleichsuntersuchungen insofern, als mit unerhitzten Milchproben wiederholt niedrigere Antibiotikamengen erfaßt wurden als mit erhitzten Proben. Andererseits bleibt zu berücksichtigen, daß durch die Erhitzung zwar ein Teil der unspezifischen Hemmstoffe inaktiviert wird, einige jedoch hitzestabil sind und auch durch diese Vorbehandlung der Proben nicht eliminiert werden (REITER, 1968, TERPLAN und ZAADHOF, 1969, KRAACK und REICHMUTH, 1971, FORSCHNER, 1973). Aufgrund dieser Tatsachen empfiehlt der Internationale Milchwirtschaftsverband (1970) auch, die Milchproben nicht zu erhitzen, sondern umgehend auf die Anwesenheit von Hemmstoffen zu untersuchen und bis zu diesem Zeitpunkt zu kühlen.

Zur Ermittlung der Ursachen und Gründe für die Ablieferung hemmstoffhaltiger Milch wurden diejenigen Lieferanten, deren Milch positiv im BRT reagierte und im Agarddiffusionstest mit PC bzw. DST einen Hemmhof von über 5 mm aufwies, anschließend befragt. Keiner der in dieser Weise aufgefallenen 407 Lieferanten verweigerte die Auskunft, wenn auch nur 298 (73,2 %) zugaben, daß am Tage der Ablieferung oder kurz zuvor eine Behandlung im Milchviehstall stattgefunden hatte. Bei einem Großteil der 109 Erzeuger, die eine therapeutische Behandlung ableugneten, dürfte es sich um Schutzbehauptungen gehandelt haben, zumal bei einem Teil der durchgeführten Befragungen ein beamteter Tierarzt des Kreises Tecklenburg anwesend war. Außerdem konnte in der Mehrzahl der betreffenden Proben der Hemmstoff durch Penicillinase vollständig oder teilweise inaktiviert werden. Vergleiche mit Untersuchungen anderer Autoren sind relativ schwer, da nur in wenigen Fällen solche Erhebungen durchgeführt wurden. MATTHEIS (1971) gibt an, daß alle von ihr befragten Landwirte wunschgemäß Auskunft gaben und nur einer von 48 abstritt, daß die Milchtiere antibiotisch

behandelt worden waren. MÜLLER (1969) konnte zwei Jahre früher bei 97 % der positiven Proben aufgrund von Befragungen den Einsatz von Antibiotika bestätigen. MOL (1968, 1970) erhielt demgegenüber 1966 von 16,2 %, 1967 von 16,8 % und 1968 von 11,6 % keinerlei Auskünfte hinsichtlich stattgefundener Behandlungen; 1969 wurden seine Fragen jedoch auch nur noch von 3,4 % nicht mehr beantwortet.

In 281 (94,3 %) Beständen war die Applikation intrazisternal erfolgt und bei 17 (5,7 %) intramuskulär. Ähnliche Werte finden sich bei MOL (1968, 1970); 1966: 73,3 % intrazisternal (i.z.), 8,1 % intramuskulär (i.m.); 1967: 77,1 % i.z., 5,5 % i.m.; 1968: 75,8 % i.z., 12,6 % i.m. und 1969: 84,6 % i.z., 8,6 % i.m.. Bei MATTHEIS (1971) gaben von 48 befragten Landwirten 46 an, daß eine Behandlung des Euters vorgenommen worden war. Nur ein Landwirt wies auf eine intramuskuläre Verabfolgung hin. Andererseits stellte die Milchzentrale Wilhelmshaven fest, daß bei Untersuchungen Mitte April 1971 die Mehrzahl der hemmstoffhaltigen Anlieferungsmilchproben aus Betrieben stammte, in denen Milchkühe nach Aussage der Besitzer angeblich intramuskulär vom Tierarzt behandelt worden waren (MATTHEIS, 1971). Es ist jedoch anzunehmen, daß - wie auch durch die eigenen Ergebnisse sowie jene von MOL (1968, 1970) und MATTHEIS (1971) bestätigt wird - die in der Milch nachweisbaren Antibiotikarückstände vorwiegend aus der intrazisternalen Applikation stammen. Die bei den anderen Verabfolgungsarten in die Milch übergehenden Antibiotikamengen sind durchweg geringer und schneller ausgeschieden (TERPLAN und ZAADHOF, 1967).

Von weiterem Interesse war, von wem die Behandlung der Milchtiere durchgeführt worden war. Von den 281 Besitzern, in deren Bestand eine intrazisternale Behandlung vorgenommen worden war, gaben 254 (90,2 %) an,

diese Injektoren selbst appliziert zu haben (32 davon auf Anweisung des Tierarztes), bei den restlichen 27 Beständen (9,8 %) war die Behandlung durch den Tierarzt erfolgt. Somit wird erneut - auch TERPLAN, ZAADHOF und MATTHEIS (1972) registrierten nur bei 13 % der intrazisternalen Behandlungen eine Vornahme durch den Tierarzt - die von SEELEMANN und OBIGER (1968) gemachte Beobachtung bestätigt, daß die Landwirte den weitaus größten Teil ihrer euterkranken Milchtiere selbst behandeln, um somit Kosten zu sparen. Die von Tierärzten oft großzügig gehandhabte Abgabe von Antibiotika an den Tierhalter oder zumindest die an diese delegierte Weiterbehandlung haben nach GROSSKLAUS (1967) dazu beigetragen, daß immer mehr Laien Euterinjektoren applizieren.

Es wurde schließlich auch zu klären versucht, ob und inwieweit den Lieferanten die Vorschriften des § 3 Nr. 1 g der Ersten Ausführungsverordnung zum Milchgesetz bekannt sind. 18 (4,4 %) Besitzer behaupteten, von einer solchen Vorschrift gar nichts zu wissen. Die anderen 389 (95,6 %) gaben jedoch zu, von dem Bestehen einer solchen Vorschrift schon gehört zu haben, z.B. vom Tierarzt. Der größte Teil dieser Milcherzeuger machte jedoch die Einschränkung, daß ihnen die dort als Ablieferungssperre aufgeführte Frist völlig unbekannt sei. Einige Lieferanten glaubten zu wissen, daß die Milch ein paar Tage nicht abgeliefert werden dürfe. Die exakte Formulierung schien keinem Landwirt bekannt. Andererseits wußten drei Milcherzeuger, daß auch nach parenteraler Behandlung Antibiotika in der Milch zu finden sein können. Die Ablieferung der hemmstoffhaltigen Milch - am Tage der Behandlung wurde die Milch nach Angaben der Milcherzeuger zumeist zurückgehalten - scheint infolgedessen teilweise dadurch bedingt zu sein, daß den Landwirten die genaue Frist des Ablieferungsverbotes

nicht bekannt ist. Hinzu dürfte jedoch kommen, daß die Landwirte glauben, bei einer weiteren Nichtablieferung der Milch unnötig Geld einzubüßen, und daher die Milch behandelte Tiere 1 - 2 Tage nach Applikation des Antibiotikums gemeinsam mit der Milch der anderen Kühe an die Molkerei abgeben. Da für die Landwirte des Kreises Tecklenburg das widerrechtliche Inverkehrbringen hemmstoffhaltiger Milch bis jetzt ohne ökonomische und rechtliche Folgen blieb, werden sie in dieser Ansicht bestärkt. Auch SEELEMANN und OBIGER (1963), LIMMER (1969) sowie MATTHEIS (1971) waren zu ähnlichen Ergebnissen gekommen. Zur Abstellung dieser nicht nur für die Gesundheit der Verbraucher, sondern auch für die Herstellung fermentativer Milcherzeugnisse nachteiligen Faktoren sind umfangreiche Maßnahmen, wie sie z.B. von TERPLAN und ZAADHOF (1967) sowie OBIGER (1970) empfohlen wurden, unbedingt erforderlich. In Schleswig Holstein (seit 1.1.1972) und in Bayern (seit 1.11.1972) wird im Rahmen der Gütebewertung der Anlieferungsmilch einmal monatlich die Freiheit von Hemmstoffen kontrolliert. Aufgrund dieser Tatsache sind nach TOLLE (1973) die Antibiotikarückstände in der Milch in den betreffenden Gebieten deutlich zurückgegangen, und zwar auf weniger als 0,5 %.

Auffällig war der im Rahmen der eigenen Untersuchungen festzustellende erhebliche Unterschied hinsichtlich der positiven Befunde mit den drei eingesetzten Verfahren. Einem Anteil von 5 % (PC) bzw. 3,2 % (DST) steht im vergleichbaren Untersuchungszeitraum seit März 1971 ein solcher von nur 1,8 % (BRT) gegenüber. Auch in den vorhergehenden drei Untersuchungsmonaten waren mit PC erheblich mehr Proben positiv zu beurteilen (5,3 %) als mit BRT (2,9 %). Zur Klärung der Frage, wodurch diese Unterschiede bedingt sein können, wurden die ab März

1971 erzielten Ergebnisse nach verschiedenen Gesichtspunkten geordnet und einander gegenübergestellt. Bei 12 555 (95,5 %) Proben wurden mit allen drei Medien gleiche Reaktionen registriert (Tab.13). Relativ häufig wurden mit PC (3,5 %), seltener mit PC und DST (0,5 %) Hemmstoffe bei gleichzeitig negativem Befund im BRT und mit DST bzw. allein im BRT nachgewiesen. Nur bei 0,4 % Proben war der Agardiffusionstest mit PC negativ, während zumindest eines der beiden anderen Verfahren positiv beurteilt wurde. Bei dem Vergleich der Befunde vor und nach Erhitzung der Milchproben (Tab.14) ergab sich bei insgesamt 11 688 (96,3%) ein gleichartiger Reaktionsausfall im Diffusionstest mit PC und BRT. Bei weiteren 9 Proben (0,1%) war die Hemmwirkung nach der Erhitzung mit beiden Medien nicht mehr nachweisbar. Recht hoch war der Anteil mit hitzestabilen Hemmstoffen (1,2%), aber auch mit hitzelabilen Substanzen (1,5%) im Agardiffusionstest mit PC, die im BRT selbst bei der Untersuchung der Rohmilch nicht erfaßt wurden (Tab.14). Die hieraus abzuleitende höhere Empfindlichkeit des *B. calidolactis* im konventionellen Agardiffusionstest mit PC als Medium speziell im Vergleich zu BRT wird auch daraus ersichtlich, daß bei 372 Proben, die im BRT negativ und im PC positiv waren, eine vollständige oder teilweise Inaktivierung dieser Hemmung durch Penicillinase gelang. Allein 225 dieser Proben wiesen vor Penicillinase-Zusatz einen Hemmhof mit einem Radius bis zu 3 mm auf, weitere 115 Proben einen solchen bis zu 6 mm. Die Unterschiede zwischen PC und DST als Medium waren weniger stark. Bei 483 mit PC positiven Proben wurde mit DST keine Hemmung beobachtet, die umgekehrte Reaktion ergab sich jedoch nur bei 31 Proben. Bei den mit beiden Tests erfaßten 385 Proben war der Hemmhof in 77 Fällen bei beiden Medien gleich groß, in 113 Fällen bei DST

Tabelle 13: Vergleich der Ergebnisse bei der Hemmstoff-
untersuchung von 13 141 Milchproben im BRT
und Agardiffusionstest mit PC und DST als
Medium

Reaktion im			Anzahl der Proben (%)
PC	DST	BRT	
-	-	-	12 234 (93,0)
+	+	+	321 (2,5)
+	-	-	467 (3,5)
-	+	-	13 (0,1)
-	-	+	8 (0,1)
+	-	+	16 (0,1)
+	+	-	64 (0,5)
-	+	+	18 (0,2)
insgesamt			13 141 (100,0)

Tabelle 14: Vergleich der Ergebnisse im Agardiffusions-
test mit PC und BRT vor und nach Erhitzung
(5 Min, 80° C) der Milchproben

Reaktion der Milch im				Anzahl der Proben (%)
Diffusionstest mit PC		BRT		
roh	erhitzt	roh	erhitzt	
+	+	+	+	169 (1,4)
+	-	+	+	20 (0,2)
+	-	+	-	9 (0,1)
+	-	-	-	188 (1,5)
-	-	-	-	11 519 (94,8)
-	-	+	+	25 (0,2)
-	-	+	-	6 (0,1)
+	+	+	-	59 (0,5)
+	+	-	-	141 (1,2)
insgesamt				12 136 (100,0)

Zeichenerklärung: + = hemmstoffhaltig;
- = hemmstofffrei

größer und in 195 Fällen bei PC größer.

Die beschriebenen Unterschiede sind erklärlich, wenn man die für die einzelnen Testsysteme angegebenen Nachweisgrenzen betrachtet. So können mit den vom Laboratorium Enterotox kommerziell vertriebenen Testtabletts nach BRUNN (1971) bzw. FORSCHNER (1972 d) etwa folgende Mengen nachgewiesen werden: Von Penicillin 0,004 bzw. 0,1 IE/ml, von Chlortetracyclin 2 bzw. 10 mcg/ml, von Streptomycin 10 mcg/ml. (Nach Gebrauchsanweisung des Herstellers, die sich z.T. auf die Ergebnisse von OBIGER (1970) stützen dürfte, sollten allerdings sogar 0,001 bis 0,005 IE/ml Penicillin und von Dihydrostreptomycin, Chloramphenicol sowie Chlor- und Oxytetracyclin jeweils 1 mcg/ml nachweisbar sein, obwohl in dem von KRAACK und TOLLE (1969) ursprünglich beschriebenen Verfahren als minimale Hemmkonzentration für Penicillin 0,007 bis 0,008 IE/ml, für Streptomycin 10 mcg/ml und für Chlortetracyclin 0,7 mcg/ml genannt wurden.) Im Agardiffusionstest mit PC wurden aber z.B. 0,0025 IE/ml Penicillin, 0,5 mcg Chlortetracyclin/ml und 1 mcg Streptomycin/ml nachgewiesen. Diese geringere Empfindlichkeit ist vermutlich weniger durch das für den BRT eingesetzte Medium als vielmehr durch die verwendeten Kulturen bedingt. Schon BRUNN (1971) sowie ZAADHOF (1971) hatten auf eine unterschiedliche Reduktion und Sensitivität bei der Verwendung von Kulturen aus Ede (Niederlande) bzw. Kiel berichtet. ZAADHOF (1971) stellte im übrigen fest, daß zur antibiotikabedingten Hemmung von *B. calidolactis* nur im Falle des Chloramphenicol bei Verwendung von PC höhere Konzentrationen erforderlich waren als bei DST. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, daß BRT als Suchtest bei Massenuntersuchungen zwar geeignet zu sein scheint, der Agardiffusionstest mit PC als Medium jedoch aufgrund leichter

Herstellung und Auswertbarkeit, höherer Sensitivität und besserer Aussagekraft in quantitativer Hinsicht (Hemmhofgröße) zu bevorzugen wäre. Dabei sollten im Hinblick auf Massenuntersuchungen die z.B. von TERPLAN und ZAADHOF (1969) oder FORSCHNER (1973 a) beschriebenen Rationalisierungsmöglichkeiten berücksichtigt werden. Wenn kommerziell vertriebene BRT-Tabletts verwendet werden, muß ihre Reaktionsfähigkeit zuvor geprüft werden. Im Rahmen der eigenen Versuche erwies sich ein Großteil der Tabletts, manchmal kurz nach der Auslieferung, als unbrauchbar. Diese Beobachtungen wurden auch von anderer Seite gemacht, insbesondere als in Bayern mit der Untersuchung auf Hemmstoffe im Rahmen der Güteprüfung begonnen wurde.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. 17 121 Anlieferungsmilchproben aus dem Einzugsgebiet fünf verschiedener Molkereien des Kreises Tecklenburg (Nordrhein-Westfalen) wurden von Dezember 1970 bis einschließlich Mai 1972, August/September 1972 und Januar 1973 entnommen und mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) und dem Agardiffusionstest mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 als Testkeim und Plate Count Agar (PC) als Medium auf antibiotisch wirksame Substanzen untersucht. Ab März 1971 lief der Agardiffusionstest mit Diagnostic Sensitivity Test Agar (DST) vergleichsweise bei 13 141 Proben mit.
2. Im BRT wurden 363 (2,1 %) Proben als positiv beurteilt, im Agardiffusionstest mit PC als Medium 868 (5,1 %) und im Agardiffusionstest mit DST als Medium 416 (3,2 %). Zwischen den Ergebnissen der fünf Molkereieinzugsgebiete bestanden deutliche Unterschiede. In den Wintermonaten (Stallhaltung) wurde durchwegs häufiger hemmstoffhaltige Milch angeliefert als in den Sommermonaten (Ausnahme Juni 1971).
3. 637 (73,6 %) der im Agardiffusionstest mit PC als Medium positiv bewerteten 868 Rohmilchproben enthielten durch Penicillinase inaktivierbare Rückstände. 438 (50,7 %) Proben wiesen nach Zusatz von Penicillinase einen deutlich kleineren Hemmhof auf, bei weiteren 199 (22,9 %) verschwand der Hemmhof vollständig.
4. Nach Erhitzung (5 Min. 80° C) reagierten im BRT von 363 positiven Rohmilchproben 269 (74,3 %) ebenfalls

positiv, im Agardiffusionstest mit PC von 586 Proben 369 (62,9 %). Beim Agardiffusionstest zeigte sich eine enge Beziehung zwischen Hemmhofgröße der untersuchten Rohmilchproben und Reaktion nach Erhitzung. Bei 205 (57,8 %) von 354 Rohmilchproben mit einem Hemmhof von weniger als 5 mm war nach der Erhitzung keine Hemmung nachweisbar.

5. Bei der Befragung von 407 Lieferanten hemmstoffhaltiger Milch gaben 298 (73,2 %) eine antibiotische Behandlung der Milchtiere vor weniger als fünf Tagen vor Ablieferung zu. In 17 Betrieben (5,7 %) war eine parenterale Behandlung erfolgt, in 281 (94,3 %) eine intrazisternale. In 254 Beständen wurde das Antibiotikum bei der intrazisternalen Behandlung vom Besitzer oder Melkpersonal injiziert.
6. Der BRT ist - sofern funktionsfähige Tabletts zur Verfügung stehen - als Suchtest gut geeignet, der Agardiffusionstest mit PC ist jedoch aufgrund seiner größeren Sensitivität und besseren Aussagekraft vorzuziehen. Der Agardiffusionstest mit DST erbringt keine Vorteile gegenüber jenem mit PC.

6. SUMMARY

1. From December 1970 to May 1972, during August/September 1972 and January 1973 17.121 samples of raw milk delivered to five dairies within the region of Tecklenburg (Northrhine-Westfalia) were tested for antibiotic residues using brilliant black reduction test (BRT) and agar diffusion test (with plate count agar as medium = PC) respectively with *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 as test organism. Since March 1971 the agar diffusion test was also performed with diagnostic sensitivity test agar as medium (DST) on a total of 13.141 samples.
2. With BRT 363 (2,1 %) samples were found to contain inhibitory substances, with agar diffusion test with PC 868 (5,1 %) and with DST 416 (3,2 %) samples respectively. Distinct differences existed in the frequency of positive results between the five dairies. During wintertime the dairies were supplied with milk containing inhibitory substances oftener than in summer (except June 1971).
3. In 637 (73,6 %) of the 868 positive samples (PC) the presence of penicillin was confirmed by inactivation with penicillinase. 438 (50,7 %) samples showed after addition of penicillinase a distinct smaller inhibition zone, 199 (22,9 %) no inhibition at all.
4. 269 (74,3 %) of the 363 BRT-positive samples showed a positive reaction also after heating (80° C for 5 min.) whereas 369 (62,9 %) of 586 positive samples

in the agar diffusion test (PC) remained positive. A close correlation was found between the size of the inhibition zone of the raw milk samples and the reaction of these samples after heating: 205 (57,8 %) of 354 raw milk samples with an inhibition zone smaller than 5 mm showed no inhibition after heating.

5. Positive results were followed up by interviewing 407 milk producers of whom 298 (73,2 %) confessed an antibiotic treatment of the cows less than five days before delivering the raw milk. On 17 farms (5,7 %) the antibiotics were administered parenterally, on 281 farms (94,3 %) intermammarily. In 254 herds the antibiotic was injected intramammarily by the farmer or his herdsman.
6. BRT is, if functioning tabletts are available, a suitable screeningtest, but the agar diffusion test with PC as medium is to prefer on account of its greater sensitivity and statement. The agar diffusion test with diagnostic sensitivity test agar as medium showed no advantage compared with the agar diffusion test with plate count agar as medium.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ASHTON, D.H. und F.F. BUSTA (1968):

Milk components inhibitory to *Bacillus stearothermophilus*.

J. Dairy Sci. 51, 842 - 847.

ASHTON, D.H., F.F. BUSTA und J.A. WARREN (1968):

Relief of casein inhibition of *Bacillus stearothermophilus* by iron, calcium, and magnesium.

Appl. Microbiol. 16, 628 - 635.

AUCLAIR, J. (1964):

in Microbial Inhibitors in Food, S. 281

Ed. by Molin, N.; Verlag Almquist und Wiksell, Stockholm
zit. nach REITER, B. und J.D. ORAM (1967).

BECK, G. (1964):

Inwieweit wird in der Frischmilch das Vorhandensein von
Antibiotika, Pflanzenschutz-, Schädlingsbekämpfungs-
und Vorratsschutzmitteln kontrolliert?

Molk. und Käs. Ztg., 15, 1810 - 1811.

BECKER, W. (1966):

Zerstörung von Antibiotika in der Milch durch Kurz-
zeiterhitzung.

Milchwiss. 21, 155 - 157.

BERTELSEN, E. (1952):

Mejeritekn. Medd. 13, 3

zit. nach OVERBY, A.J. (1954).

BRUNN, H.J. (1971):

Untersuchungen über die Anwendung einiger Nachweismethoden zur Feststellung von Antibiotika in Milch.
Vet. med. Diss., Gießen.

BRUNSCHWILER, F. (1961):

Die Ausscheidungsdauer verschiedener Antibiotika bei intramammärer Behandlung des Rindes.
Vet. med. Diss., Bern.

BUCHMANN, F. (1972):

Zur Standardisierung eines Hemmstofftestes für Milch.
Korreferat 14. Arbeitstagung ALTS 15/17.11.1972
Berlin.

BUSTA, F.F. (1966):

Milk component(s) inhibitory to *Bacillus stearothermophilus*.
J. Dairy Sci. 49, 751 - 756.

CHEESEMAN, G.C. und D.J. JAYNE-WILLIAMS (1964):

An inhibitory substance present in milk.
Nature 204, 688 - 689.

CRAWFORD, R.J.M. und J.H. GALLOWAY (1964):

Testing milk for antibiotic residues.
Dairy Ind. 29, 255 - 262.

DOAN, F.J. (1950):

Antibiotics in milk.
Milk Dealer 40, 102
zit. nach OVERBY, A.J. (1954).

DREWES, K. (1927):

Über die Bakterizidie der Milch.
Milchw. Forsch. 4, 403 - 430.

FOKKER, A.P. (1890):

Über bakterienvernichtende Eigenschaften in der Milch.
Zschr. Hyg. 9, 41 - 55.

FORSCHNER, E. (1972 a):

Rationalisierungsmöglichkeiten beim Nachweis von Hemmstoffen in Milch im Agardiffusionsverfahren.

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 101 - 104.

DERSELBE (1972 b):

Vergleichende Untersuchungen des Agar Diffusionstestes auf Basis des Bac. stearothermophilus var. calidolactis mit anderen gebräuchlichen Hemmstoffnachweisverfahren für Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 146 - 150.

DERSELBE (1972 c):

Möglichkeiten der Stabilisierung von Untersuchungsmaterial für den biologischen Hemmstofftest.

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 195 - 198.

DERSELBE (1972 d):

Hemmstoffnachweis in der Milch.

Dtsch. Milchwirtsch. 23, (37), I - VIII.

DERSELBE (1973 a):

Das Agardiffusionssystem mit Bac. stearothermophilus var. calidolactis als Testkeim zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch. Ein Standardisierungsvorschlag.

Arch. Lebensmittelhyg. 24, 108 - 114.

DERSELBE (1973 b):

Störmöglichkeiten in biologischen Hemmstoffnachweissystemen durch Keimbelastung des Untersuchungsmaterials. Eine Studie aufgrund praktischer Erfahrungen mit Hemmstoffnachweisverfahren bei Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 24, 159 - 162.

FOSTER, J.W. und H.B. WOODRUFF (1943):

J. Bact. 46, 187

zit. nach OVERBY, A.J. (1954).

FRANK, H. (1962):

Mastitis, Antibiotika und Anlieferungsmilch.

Dtsch. Mol. Ztg. 83, 1162 - 1165.

DERSELBE (1964):

Die Auswirkung von Bacticin-Resten in der Milch auf
molkereitechnische Vorgänge.

Tierärztl. Umschau 19, 607 - 613.

DERSELBE (1965):

Nachweis von Hemmstoffen in Milch und Milchpulver.

Milchwiss. 20, 361 - 365.

FRANKLIN, J.G., D.J. WILLIAMS und L.F.L. CLEGG (1958):

Methods of assessing the sporicidal efficiency of an
ultra-hightemperature milk sterilizing plant.

J. appl. Bact. 21, 51

zit. nach BUSTA, F.F. (1956).

GALESLOOT, Th.E. und F. HASSING (1962):

Een snelle en gevoelige methode om met papierschijfjes
penicilline in melk aan te tonen.

Neth. Milk Dairy J. 16, 89 - 95.

GALESLOOT, Th.E. und H. LABOTS (1959):

Thermofiele sporevormers in melk, vooral met betrekking
tot de bereiding van gesteriliseerde melk en
chocolademelk.

Neth. Milk Dairy J. 13, 155 - 179.

GEORGAKIS, S. (1962):

Die Bakterizidie der Milch.

Vet. med. Diss., Berlin (FU).

GROSSKLAUS, D. (1967):

Antibiotikarückstände in der Trinkmilch.

Dtsch. tierärztl. Wschr. 74, 462 - 465.

HAUKE, H. (1968):

Untersuchungen über die Inaktivierung antibiotika-haltiger Milch durch die Pasteurisierung.

Mhefte Vet. Med. 23, 105 - 108.

HEESCHEN, W., J. REICHMUTH, A. TOLLE und H. ZEIDLER

(1969):

Die Konservierung von Milchproben zur bakteriologischen, zytologischen und hemmstoffbiologischen Untersuchung.

Milchwiss. 24, 729 - 734.

HENTSCHKE, J. (1972):

Zur Standardisierung eines Hemmstofftestes für Milch.

Korreferat 14. Arbeitstagung ALTS 15/17.11.1972

Berlin.

HUNTER, G.J.E. (1949):

J. Dairy Res. 16, 39, 149 und 235

zit. nach OVERBY, A.J. (1954).

IGARASHI, R.T., R. BAUGHMAN, F.E. NELSON und

P.A. HARTMAN (1961):

Rapid antibiotic assay methods using *Bacillus stearothermophilus*.

J. Milk Food. Techn. 24, 143 - 146

INTERNATIONALER MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND (1967):
Methods for the detection of antibiotics in milk and
milk products.
Report V-Doc 81.

DERSELBE (1970 a):
The detection of antibiotics in milk and milk products.
E - Doc 13.

DERSELBE (1970 b):
Detection of penicillin in milk by a disk assay
technique.
Internat. Standard 57.

IWAIDA, M. und T. TSUGO (1970):
Detection of penicillin in milk by means of sensitivity
disks with *Bacillus calidolactis* as test organism.
J. Food Hyg. Soc. Japan, 11, 389 - 395
Ref.: Dairy Sci. Abstr. 35 (1973), 16.

JACOBS, J. (1963):
Detection and significance of penicillin in milk.
Tijdschr. Diergeneesk. 88, 1055 - 1065.

JEPSEN, A. und A.J. OVERBY (1951):
Maelkeritidende 64, 355
zit. nach OVERBY, A.J. (1954).

JONES, F.S. und H.S. SIMMS (1930):
The bacterial growth inhibitor (lactenin) of milk.
J. Exper. Med. 51, 327 - 329.

KATZNELSON, H. und E.G. HOOD (1949):
Influence of penicillin and other antibiotics on lactic
streptococci in starter cultures used in cheddar
cheesemaking.
J. Dairy Sci. 32, 961 - 968.

KAY, H.W. (1969):

Bericht über die 53. Jahresversammlung des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes 1969.

Milchwiss. 24, 596 - 607.

KLEIN, D. (1972):

Der Hemmstoff- und Hormonnachweis bei Schlachttieren. Tierärztl. Umschau 27, 24 - 28.

KLEIN, P. (1957):

Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis.

Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg.

KLEINSCHROTH, E. und J. KRAACK (1969):

Der Brillantschwarz-Reduktionstest im BMR-System zur Untersuchung der Milch auf Hemmstoffe.

Dtsch. Molk. Ztg. 90, 2244 - 2245.

KOLLEGIUM DER BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG KIEL (1969):

Die hygienische Wertigkeit der Rohmilch und Empfehlungen zu ihrer weiteren Verbesserung.

Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsber. 21, 201 - 356.

KRAACK, J. und J. REICHMUTH (1971):

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest. II. Teil: Zur Hemmwirkung weiterer Substanzen auf das Wachstum von *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis*.

Arch. Lebensmittelhyg. 22, 82 - 86.

KRAACK, J. und A. TOLLE (1967):

Brillantschwarz-Reduktionstest mit *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch.

Milchwiss. 22, 669 - 673.

DIESELBEN (1969):

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem
Brillantschwarz-Reduktionstest. I. Teil: Verbesserte
Methodik.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145 - 149

KRIENKE, W.A. und E.L. FOUTS (1950):

Effects of storage on penicillin in dairy products.
J. Dairy Sci. 33, 403 - 404.

KUNDRAT, W. (1968):

Methoden zur Bestimmung von Antibiotica-Rückständen
in tierischen Produkten.

Z. Anal. Chem. 243, 624 - 630.

DERSELBE (1972):

45-Minuten-Schnellmethode zum mikrobiologischen Nach-
weis von Hemmstoffen in tierischen Produkten.

Fleischwirtschaft 52, 485 - 487.

LANG, K. (1967):

Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Hemm-
stoffen in der Milch.

Milchwiss. 22, 230 - 238.

LIMMER, H.D. (1969):

Hemmstoffe in der Milch.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 227 - 231.

LIMMER, H.D. und R. WÖBBECKE (1972):

Säuerungsträge und hemmstoffhaltige Milch.

Dtsch. Milchwirtsch. 23, 2034 - 2035.

LUKASS, H. (1971):

Untersuchungen über die Auswirkung der Erhitzung antibiotischer Reinsubstanzen und Antibiotika in Organ- und Fleischproben normalgeschlachteter Kälber auf die biologische Aktivität im mikrobiologischen Hemmstofftest.

Vet. med. Diss., Hannover.

LUPKE, H. (1972):

Hemmstoffuntersuchungen in Rohmilch im Hinblick auf Qualitätsbewertung und -bezahlung.

Dtsch. Mol. Ztg. 93, 1421 - 1430.

MATSUMOTO, M., K. ZINBO und M. HARUTA (1969):

Factors affecting formation of the clear zone in the disk assay method.

Ann. Rep. Tokyo Metrop. Res. Lab. Public Health 21, 35 - 40

Ref.: Dairy Sci. Abstr. 35 (1973), 190.

MATTHEIS, A. (1971):

Erhebungen über den Hemmstoffgehalt von Anlieferungsmilchproben im Einzugsgebiet einer norddeutschen Molkerei.

Vet. med. Diss., Hannover.

MAXCY, R.B. und R.C. CHANDAN (1962):

Inhibitory effects of fatty acids and other surface-active compounds on *Streptococcus lactis*.

J. Dairy Sci. 45, 654.

MEEDER, K. (1964):

Versuche über die bakterizide Wirkung von Rohmilch aus gesunden, nicht infizierten Eutern.

Vet. med. Diss., München.

MEEWES, K.H. und S. MILOSEVIC (1954):

Untersuchungen zur biologischen Antibiotika-Bestimmung in unsterilen Substanzen mit besonderer Berücksichtigung der Rohmilch.

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 6, 59 - 74.

MIETH, K. und I. WILKE (1965):

Die Ausscheidungsdauer verschiedener antibiotika-haltiger Mastitispräparate durch die Milch.

Mhefte Vet. med. 20, 361 - 370.

MOCKLER, S. (1961):

Untersuchungen über das Vorkommen von Hemmstoffen in Vorzugsmilchproben des Reg.-Bez. Nordwürttemberg im Jahre 1959.

Vet. med. Diss., München.

MOL, H. (1968):

Het voorkomen van antibiotica-residuen in aan de zuivelfabriek afgeleverde volle melk.

Tijdschr. Diergeneesk. 93, 579 - 583.

DERSELBE (1969):

A rapid and sensitive test for the detection of penicillin in milk, using test plates which can be kept in stock ready for use.

Neth. Milk Dairy J. 23, 153 - 162.

DERSELBE (1970):

Antibioticaresiduen in aan de zuivelfabriek afgeleverde volle melk in de jaren 1968 en 1969.

Tijdschr. Diergeneesk. 95, 981 - 986.

MÜLLER, F. (1969):

Der Brillantschwarz-Reduktionstest zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch und seine Anwendung in der Praxis.

Schweizer. Milchztg. 95, 119.

NEUMANN, H.-J. (1972):

Zur Konzentration der Milchhygiene- und Milchqualitätsüberwachung in Schleswig-Holstein.

Tierärztl. Umschau 27, 579 - 583.

NEUMANN, H.-J., H. LUPKE, H.-J. KÜHN, W. PETERSEN und H. BILLMAYER (1971):

Modernisierung der tierärztlichen Milchüberwachung in Schleswig-Holstein.

Tierärztl. Umschau 26, 465 - 470.

NICKELS, C. (1967):

New method for detecting penicillin in milk.

Svenska Mejeritidn. 59, 579 - 580 und 582

Ref.: Dairy Sci. Abstr. 30 (1968), 49.

OBERZILL, W. (1962):

Die Antibiotika. Bd. I/1. Verlag Hans Carl, Nürnberg
zit. nach LUKASS, H. (1971).

DERSELBE (1967):

Mikrobiologische Analytik. Verlag Hans Carl, Nürnberg
zit. nach PICHNARCIK, J., S. WENZEL und W. GISSKE
(1969).

OBIGER, G. (1963):

Hemmstoffe in der Anlieferungsmilch und Methoden zu ihrem Nachweis.

Arch. Lebensmittelhyg. 14, 10 - 19.

DERSELBE (1970):

Das Problem der Fremd- und Wirkstoffe in Rohmilch sowie ihrer Ermittlung - Betrachtung zum Hemmstoffnachweis mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest.

Arch. Lebensmittelhyg. 21, 209 - 217.

GRAM, J.D. und B. REITER (1968):

Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents.

Biochim. Biophys. Acta 170, 351 - 365.

OVERBY, A.J. (1952):

Nord. vet. Med. 4, 993

zit. nach OVERBY, A.J. (1954).

DERSELBE (1954):

Antibiotics in milk.

Dairy Sci. Abstr. 16, 1 - 23.

PACIFICI, L., F. AMATO und A. DRACOS (1970):

Methods of detecting antibiotics in milk.

Nuovi Annali Ig. Microbiol. 21, 362 - 380

Ref.: Dairy Sci. Abstr. 33 (1971), 792.

PEDERSEN, A.H. und A. MØLLER-MADSEN (1951):

Beretn. Forsøgsm. Kbh. 64

zit. nach OVERBY, A.J. (1954).

PICHNARCIK, J., S. WENZEL und W. GISSKE (1969):

Beitrag zur Methodik des Hemmstoffnachweises in Organen und Muskulatur von Schlachttieren.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 272 - 279.

PILET, Ch. und B. TOMA (1969):

Etude sur la thermostabilité de quelques antibiotiques.

Recueil de Médecine vet. 9, 897 - 909.

RACKOW, H.G. und W. WELZ (1962):

Der Hemmstoffnachweis im Rahmen der Vorzugsmilchüberwachung.

Arch. Lebensmittelhyg. 13, 206 - 208.

DIESELBEN (1964):

Weitere Ergebnisse und Erfahrungen mit einem Hemmstofftest bei Milchuntersuchungen.

Arch. Lebensmittelhyg. 15, 49 - 53.

REITER, B. (1968):

Grundlegende Probleme der Mastitisforschung.

Österr. Milchwirtsch. 23, 325 - 329 und 346 - 351.

REITER, B. und J.D. ORAM (1967):

Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids.

Nature 216, 328 - 330.

ROEMPP, H. (1962):

Chemie Lexikon;

Band I, S. 614

Franckh'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

SCHRAUDY, E. und W. RAUSCHER (1972):

Ein Beitrag zum Nachweis von Antibiotika in der Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest.

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 117 - 121.

SEELEMAN, M. und G. OBIGER (1963):

Die Antibiotika und die aus ihrer Anwendung für die Milchwirtschaft sich ergebenden Probleme.

Milchwiss. 18, 462 - 469.

SEELER, G. (1973):

Säuerungs- und Hemmstoffteste bei Milch.

Dtsch. Milchwirtsch. 24, 1068 - 1069.

SHAHANI, K.M. (1957):

The effect of heat and storage on the stability of aureomycin in milk, buffer, and water.

J. Dairy Sci. 40, 289 - 296.

DERSELBE (1958):

Factors affecting terramycin activity in milk, broth, buffer, and water.

J. Dairy Sci. 41, 382 - 391.

SHAHANI, K.M., I.A. GOULD, H.H. WEISER und W.L. SLATTER (1954/55):

Effect of the heat treatments on streptomycin and chlortetracycline in milk.

Antibiotiox Annal 2, 353 - 360.

DIESELBEN (1956):

Stability of small concentrations of penicillin in milk as affected by heat treatment and storage.

J. Dairy Sci. 39, 971 - 977.

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1967):

Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch - eine kurze Übersicht.

Milchwiss. 22, 761 - 771.

DIESELBEN (1969):

Der Nachweis von Hemmstoffen in der Milch mit *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* im Agardiffusions-test und TTC - Schnelltest.

Arch. Lebensmittelhyg. 20, 279 - 284.

TERPLAN, G., K.-J. ZAADHOF und A. MATTHEIS (1972):
Erhebungen über das Vorkommen von Antibiotika in der
Anlieferungsmilch.

Arch. Lebensmittelhyg. 23, 29 - 34.

TERPLAN, G., K.-J. ZAADHOF, H. ANGERSBACH und
M. SKARLAKIDOU (1973):

Zur Abgrenzung unspezifischer Hemmungen von
B. stearoothermophilus var. *calidolactis* beim Nachweis
von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs
(vorläufige Mitteilung).

Arch. Lebensmittelhyg. 24, 90 - 92.

TOLLE, A. (1973):

Aktuelle Fragen der künftigen Qualitätsbeurteilung von
Roh- und Konsummilch.

Molkerei-Ztg. Welt der Milch 27, 879 - 885.

TOLLE, A., H. ZEIDLER, W. HEESCHEN, J. KRAACK und
J. REICHMUTH (1968):

Untersuchungen über somatische Zellen, saprophytäre
Keime und antibiotisch wirksame Hemmstoffe in der Roh-
milch aus 12 Einzugsgebieten der BRD.

Kieler Milchwirtsch. Forschungsber. 20, 343 - 394.

TREMBATH, R.H. (1950):

Aust. J. Dairy Tech. 5, 143

zit. nach OVERBY, A.J. (1954).

VARABIOFF, Y. und P.C. LOANE (1970):

Observations on two disk assay methods for the
detection of penicillin in market milk.

Austr. J. Dairy Tech. 25, 142 - 144.

WAGNER, G. (1965):

Untersuchungen über antibakterielle Hemmstoffe im
Zitzengewebe des Rindereuters.

Vet. med. Diss., München.

WALTER, A.M. und L. HEILMEYER (1969):

Antibiotika-Fibel 3. Aufl.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

WATROUS, G.H., D.V. JOSEPHSON, F.J. DOAN und

D.R. ELLIOT (1962):

Problems in the routine detection of antibiotics in
milk.

XVI. Int. Dairy Congress C, 521 - 528.

WATTS, P.S. und D.H. McLEOD (1946):

J. Comp. Path. 56, 170

zit. nach OVERBY, A.J. (1954).

WODSAK, W. (1959):

Bedeutung und Nachweis der Antibiotica in der Milch.

Die Nahrung 3, 729 - 736.

ZAADHOF, K.-J. (1971):

Über die Eignung von mikrobiologischen Nachweisver-
fahren für Hemmstoffe in Milch.

Vortrag 14. Arbeitstagung Lebensmittelhygiene der
Deutschen Veterinär-medizinischen Gesellschaft in
Freiburg/Brsg. am 30.9.1971.

ZEITRÄG, K.H. (1970):

Zum biologischen Nachweis aus Futterpflanzen stammender
Hemmstoffe in der Milch.

Vet. med. Diss., Hannover.

BAYERISCHES GESETZ- und VERORDNUNGSBLATT (1972):

Verordnung über die Gütebezahlung der Anlieferungsmilch
(Güteverordnung) vom 27. September 1972,
Seite 436 - 440.

BUNDESGESETZBLATT (1973):

Verordnung über gesundheitliche Anforderungen an Roh-
milch und daraus hergestellte Erzeugnisse, die von
Milcherzeugern unmittelbar an Verbraucher abgegeben
werden (Hygiene-Verordnung für Milch-ab-Hof-Abgabe)
vom 24. Mai 1973, Seite 477 - 492.

GESETZBLATT FÜR BADEN-WÜRTTEMBERG (1973):

Verordnung des Ministeriums für Ernährung, Landwirtschaft
und Umwelt und des Ministeriums für Wirtschaft, Mittel-
stand und Verkehr über Prüfung und Bezahlung von Milch
(Gütebezahlungsverordnung) vom 4. Juni 1973, Seite 194 -
199.

GESETZ- und VERORDNUNGSBLATT FÜR DAS LAND NORDRHEIN-
WESTFALEN (1973):

Achte Verordnung zur Änderung der Güteverordnung Milch
vom 17. Juli 1973, Seite 401 - 403.

GESETZ- und VERORDNUNGSBLATT FÜR SCHLESWIG-HOLSTEIN
(1971):

Landesverordnung zur Änderung der Qualitätsbezahlungs-
Verordnung vom 16. Juli 1971, Seite 423 - 424.

Herrn Prof. Dr. Terplan danke ich für die Überlassung des Themas.

Mit den Untersuchungen wurde bereits begonnen, als Prof. Dr. Terplan noch Direktor des Instituts für Milchkunde an der Tierärztlichen Hochschule Hannover war. In dieser Zeit standen auch Mittel des Bundesministeriums für Jugend, Familie und Gesundheit zur Verfügung. Für dieses Entgegenkommen sei an dieser Stelle gedankt.

Herrn Dr. K.-J. Zaadhof gilt mein besonderer Dank für die jederzeit gewährte Hilfe und Anregungen bei der Versuchsanordnung und Auswertung der Untersuchungen.

Bei Herrn Krs.-Vet.-Rat Dr. Lindfeld vom Veterinäramt des Kreises Tecklenburg bedanke ich mich für die immer großzügig gewährte Hilfe bei der praktischen Durchführung und Bereitstellung des Untersuchungsmaterials für diese Arbeit.

In diesen Dank beziehe ich ausdrücklich und gerne die Mitarbeiter des Labors beim Veterinäramt in Tecklenburg mit ein.

Lebenslauf

Am 13. März 1946 wurde ich als zweites Kind des Tierarztes Dr. Friedrich Gerhard Flaßhoff und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Franke in Dinslaken geboren. 1952 wurde ich eingeschult. Ab 1956 besuchte ich das Gymnasium in Wesel, wechselte 1958 wieder auf die Volksschule in Tecklenburg, um 1959 das dortige Aufbaugymnasium zu besuchen. 1965 legte ich die Reifeprüfung ab.

Es folgte die Ableistung des Wehrdienstes von 1965 bis 1967.

Danach begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Universität München. 1969 wechselte ich auf die Tierärztliche Hochschule Hannover. Hier legte ich 1973 die Tierärztliche Prüfung ab.

Seit 1973 bin ich als Assistent in verschiedenen Praxen tätig.

